

**PENINGKATAN PRODUKSI SENYAWA *THYMOQUINONE* PADA KULTUR
SUSPENSI SEL JINTAN HITAM (*Nigella sativa* L.) MENGGUNAKAN ELISITOR
ASAM SALISILAT DAN METIL JASMONAT**

TESIS

**oleh
PUTRO AJI PRAMONO
186090100011007**



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2021**

**PENINGKATAN PRODUKSI SENYAWA *THYMOQUINONE* PADA KULTUR
SUSPENSI SEL JINTAN HITAM (*Nigella sativa* L.) MENGGUNAKAN ELISITOR
ASAM SALISILAT DAN METIL JASMONAT**

TESIS

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains dalam Bidang Biologi**

**oleh
PUTRO AJI PRAMONO
186090100011007**



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2021**

HALAMAN PENGESAHAN TESIS

PENINGKATAN PRODUKSI SENYAWA *THYMOQUINONE* PADA KULTUR SUSPENSII SEL JINTAN HITAM (*Nigella sativa* L.) MENGGUNAKAN ELISITOR ASAM SALISILAT DAN METIL JASMONAT

PUTRO AJI PRAMONO

186090100011007

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 7 Juli 2021
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui

Pembimbing I

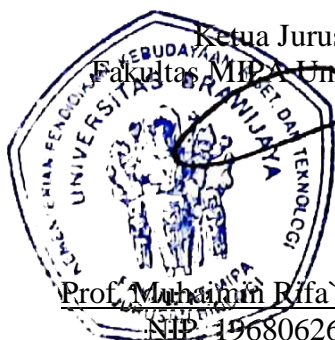
Dr. Dra. Wahyu Widoretno, M.Si
NIP. 19630414 198903 2 001

Pembimbing II

Dra. Nunung Harijati, M.Si, Ph.D
NIP. 19611105 199002 2 001

Mengetahui

Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya



Prof. Muhammad Rifa'i, S.Si., Ph.D.Med.Sc
NIP. 19680626 199702 1 001

Ketua Program Studi Magister Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Prof. Amin Setyo Leksono, S.Si., M.Si., Ph.D
NIP. 19721117 200012 1 001

SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS

Judul Tesis:

PENINGKATAN PRODUKSI SENYAWA *THYMOQUINONE* PADA KULTUR SUSPENSI SEL JINTAN HITAM (*Nigella sativa* L.) MENGGUNAKAN ELISITOR ASAM SALISILAT DAN METIL JASMONAT

Nama : Putro Aji Pramono

NIM : 186090100011007

KOMISI PEMBIMBING :

Ketua : Dr. Dra. Wahyu Widoretno, M.Si.

Anggota : Dra. Nunung Harijati, M.Si, Ph.D.

TIM DOSEN PENGUJI :

Dosen Penguji I : Ir. Retno Mastuti, M.Agr.Sc, D.Agr.Sc.

Dosen Penguji II : Dr. Dra. Aminatun Munawarti, M.Si.

Tanggal Ujian : 7 Juli 2021

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam Naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia Tesis (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 2 dan pasal 70).

Malang, 27 Juli 2021



Nama : Putro Aji Pramono
NIM : 186090100011007

PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

RIWAYAT HIDUP

Putro Aji Pramono. Surabaya, 29 Pebruari 1996 anak dari bapak R.B.B. Soerjorihandono dan ibu Djudjuk Triwardani yang berdomisili di Sidoarjo. Penulis menempuh pendidikan dasar di SDN Blurukidul 1 Sidoarjo, pendidikan menengah pertama di SMPN 1 Taman Sidoarjo dan pendidikan menengah atas di SMA Muhammadiyah 2 Sidoarjo dan lulus pada tahun 2013. Studi S1 ditempuh di Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan lulus ditahun 2017 dengan judul tugas akhir “Induksi Kalus Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) dengan Menggunakan Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D dan Kinetin melalui Teknik Kultur Jaringan”. Pengalaman kerja sebagai planter di Laboratorium Kultur Jaringan Vilant Lab Kota Batu tahun 2017, asisten dosen di Laboratorium Kewirausahaan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya dari tahun 2017 hingga awal tahun 2019, dan sekarang bekerja di DJ3 Engginering Sidoarjo sebagai surveyor dan pengawas proyek lapangan.

Malang, Juli 2021

Penulis

RINGKASAN

Peningkatan Produksi Senyawa *Thymoquinone* pada Kultur Suspensi Sel Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) Menggunakan Elisitor Asam Salisilat dan Metil Jasmonat

Putro Aji Pramono, Wahyu Widoretno, Nunung Harijati
Program Magister Biologi, Jurusan Biologi,
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
2021

Jintan hitam (*Nigella sativa* L.) merupakan tanaman semusim dengan habitus terna dan bijinya sering digunakan sebagai obat tradisional yang semakin banyak diterapkan dalam dunia medis. Biji jintan hitam memiliki senyawa utama berupa *thymoquinone* dari golongan minyak atsiri (monoterpen). Tanaman jintan hitam merupakan tanaman subtropis dan belum banyak dibudidayakan di Indonesia. Kandungan senyawa *thymoquinone* hasil budidaya di Indonesia sangat rendah jika dibandingkan dengan di Negara-negara subtropis. Untuk memenuhi kebutuhan biji jintan hitam dalam negeri, Indonesia masih mengimpor dari berbagai negara seperti India, Mesir dan negara mediterania lainnya. Total impor jintan hitam oleh Indonesia meningkat dari tahun ke tahun. Kultur jaringan tumbuhan dapat digunakan sebagai teknik untuk senyawa bioaktif skala besar tanpa dipengaruhi kondisi lingkungan. Kultur suspensi sel merupakan salah satu teknik alternatif untuk meningkatkan produksi minyak jintan hitam. Elisitasi merupakan teknik yang mengacu pada fenomena alam dalam mekanisme pertahanan tumbuhan terhadap cekaman maupun patogen. Asam salisilat / *salicylic acid* (SA) dan metil jasmonat / *methyl jasmonates* (MJ) merupakan elisitor abiotik yang banyak digunakan untuk meningkatkan metabolit sekunder. Penambahan elisitor SA dan MJ pada media kultur suspensi sel jintan hitam diharapkan dapat meningkatkan senyawa minyak atsiri jintan hitam.

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2020 - April 2021 bertempat di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Kultur dan Mikroteknik, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya dan analisis GC-MS dilakukan di laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang. Tahapan kegiatan penelitian meliputi induksi dan multiplikasi kalus dari eksplan biji, inisiasi dan pemeliharaan kultur suspensi sel, elisitasi kultur suspensi dengan elisitor SA dan MJ serta analisis komponen dan kandungan minyak atsiri pada kultur suspensi sel jintan hitam dengan GC-MS. Induksi kalus dilakukan dengan mengkultur biji pada media perlakuan MS + NAA 1 mg/L dengan berbagai konsentrasi kinetin (0; 0,5; 1; 2 dan 3 mg/L) selama lima minggu. Respon pembentukan dan pertumbuhan kalus dievaluasi setelah lima minggu kultur. Kalus hasil perlakuan terbaik dimultiplikasi sebanyak dua kali subkultur untuk mendapatkan kalus yang remah dan seragam. Kultur suspensi sel diinisiasi dan dimultiplikasi dengan mentransfer kalus pada media cair MS + NAA 1 mg/L + kinetin 2 mg/L. Kultur suspensi sel diinkubasi dalam *incubator-shaker* dengan kecepatan 110 rpm di bawah kondisi gelap pada suhu $24\pm 1^{\circ}\text{C}$. Kurva pertumbuhan kultur suspensi sel selama 14 hari kultur sebagai dasar penentuan lama elisitasi. Evaluasi pertumbuhan kultur suspensi sel diamati yang meliputi *Settled Cell Volume* (SCV), *Packed Cell Volume* (PCV), berat basah, berat kering, indeks pertumbuhan dan viabilitas sel. Komponen dan kadar senyawa minyak jintan hitam pada kultur suspensi sel hasil elisitasi dianalisis menggunakan metode GC-MS.

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian berupa Rancangan Acak Kelompok dengan dua faktor. Faktor pertama jenis elisitor (SA dan MJ) dan faktor kedua konsentrasi elisitor (0, 50, 100, 150 dan 200 μM). Total perlakuan sebanyak 10 perlakuan dengan setiap perlakuan terdiri dari 10 ulangan. Data kuantitatif dianalisis dengan menggunakan

Analysis of Variance untuk mengetahui adanya pengaruh elisitor (SA dan MJ) dan konsentrasi elisitor terhadap pertumbuhan kultur suspensi sel jantan hitam. Apabila terdapat perbedaan yang nyata dari faktor maka dilanjutkan menggunakan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* ($\alpha = 0,05$) dan uji *Independent sample T-test* dengan kepercayaan 95%.

Hasil induksi kalus biji jantan hitam menunjukkan konsentrasi kinetin dapat mempengaruhi pertumbuhan kalus jantan hitam secara signifikan terhadap waktu muncul kalus, persentase eksplan hidup, persentase eksplan membentuk kalus dan berat basah kalus. Media induksi kalus MS + NAA 1 mg/L + kinetin 2 mg/L menghasilkan pertumbuhan kalus optimal dengan rata-rata waktu muncul kalus 13 hari, persentase eksplan hidup dan persentase eksplan membentuk kalus mencapai 84% dan rata-rata berat basah kalus tiap eksplan sebesar 0,1699 gram.

Subkultur kalus sebanyak dua kali pada media MS + NAA 1 mg/L + kinetin 2 mg/L menghasilkan kalus yang remah yang sangat sesuai untuk materi inisiasi kultur suspensi sel. Hasil pengkuran SCV pada kultur suspensi sel selama 14 hari diperoleh kurva pertumbuhan kultur suspensi sel yang meliputi fase lag (hari ke 0-2), fase eksponensial (hari ke 3-9) dan fase stasioner (hari ke 10-14). Pemberian elisitor SA dan MJ pada kultur suspensi sel selama 14 hari berpengaruh terhadap pertumbuhan kultur suspensi sel. Hasil ANOVA dua arah menunjukkan bahwa SCV, PCV, berat basah, berat kering dan indeks pertumbuhan kultur sel jantan hitam dipengaruhi secara nyata oleh konsentrasi elisitor tetapi tidak dipengaruhi oleh jenis elisitor dan interaksi antara jenis elisitor dan konsentrasi elisitor. Sementara itu, viabilitas sel dipengaruhi oleh interaksi jenis dan konsentrasi elisitor. Pemberian elisitor pada media kultur suspensi sel menghambat SCV, PCV, berat basah, berat kering sel dan indeks pertumbuhan. Semakin tinggi konsentrasi elisitor SA dan MJ semakin besar penghambatan pertumbuhan kultur suspensi sel. Elisitor SA menyebabkan kematian sel lebih banyak dibandingkan elisitor MJ.

Jumlah komponen minyak jantan hitam pada biji jantan hitam dan kultur suspensi sel kontrol masing-masing sebanyak 71 dan 70 komponen. Komponen minyak jantan hitam pada suspensi sel hasil elisitasi teridentifikasi 71-74 komponen. Kelimpahan senyawa utama minyak jantan hitam pada kultur suspensi sel lebih tinggi dibandingkan dengan pada biji, yaitu *Thymoquinone* (4,700 dan 4,722%), *thymol* (3,194 dan 3,209%), *p-cymene* (0,535 dan 0,537%), *α -thujene* (2,145 dan 2,154%) dan *β -pinene* (3,265 dan 3,280%). Kelimpahan komponen utama pada kultur suspensi sel dengan penambahan elisitor SA dan MJ sedikit lebih rendah dibandingkan dengan pada biji dan kultur suspensi sel tanpa elisitasi. Kadar *thymoquinone* pada biji jantan hitam (1266,614 $\mu\text{g/g}$ BB) lebih tinggi dibandingkan dengan kadar senyawa *thymoquinone* pada kultur suspensi kontrol (1173,799 $\mu\text{g/g}$ BB). Elisitasi dengan SA dan MJ dengan konsentrasi 25-100 μM pada kultur suspensi sel dapat meningkatkan kadar senyawa *thymoquinone* dan 4 senyawa utama minyak jantan hitam yang lain (*p-cymene*, *α -thujene*, *β -pinene* dan *thymol*), jauh lebih tinggi dibandingkan dengan pada biji. Kadar *thymoquinone* pada kultur suspensi sel hasil elisitasi dengan MJ berkisar 1777,858 $\mu\text{g/g}$ BB dan 2253,248 $\mu\text{g/g}$ BB, sedangkan hasil elisitasi dengan SA sebesar 1143,288 $\mu\text{g/g}$ BB dan 1705,346 $\mu\text{g/g}$ BB. Elisitasi dengan MJ pada kultur suspensi sel meningkatkan kadar senyawa utama minyak jantan hitam lebih tinggi dibandingkan SA. Elisitasi kultur suspensi sel dengan asam salisilat 100 μM mampu meningkatkan kadar senyawa utama jantan hitam sebesar 1,35 kali lipat dibandingkan dari biji, sedangkan MJ 100 μM mampu meningkatkan kadar senyawa utama jantan hitam sebesar 1,78 kali lipat dibandingkan dari biji.

Kata kunci: Asam salisilat, *Nigella sativa* L., Metil jasmonat, Kultur suspensi sel, *Thymoquinone*

SUMMARY

Increased Thymoquinone Compound Production in Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Cell Suspension Culture Using Salicylic Acid and Methyl Jasmonate Elicitor

Putro Aji Pramono, Wahyu Widoretno, Nunung Harijati
Biology Master Program, Biology Department, Mathematics and Natural Sciences Faculty,
Brawijaya University
2021

Black cumin (*Nigella sativa* L.) is an annual plant with herb habitus and its seeds are often used as a traditional medicine that is increasing being applied in the medical world. Black cumin seeds have the main compound in the form of thymoquinone from the volatile oil (monoterpene) group. Black cumin is a subtropical plant and has not been widely cultivated in Indonesia. The content of thymoquinone compounds cultivated in Indonesia is very low when compared to subtropical countries. To meet the domestic demand for black cumin seeds, Indonesia still imports from various countries such as India, Egypt, and other Mediterranean countries. The total import of black cumin by Indonesia has increased from year to year. Plant tissue culture can be used as a technique for large-scale bioactive compounds without being influenced by environmental conditions. Cell suspension culture is an alternative technique to increase the production of black seed oil. Elicitation is a technique that refers to natural phenomena in plant defense mechanisms against stress and pathogens. Salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MJ) are abiotic elicitors that are widely used to increase secondary metabolites. The addition of SA and MJ elicitors to the culture media of black cumin cell suspension is expected to increase the compound of black cumin essential oil.

This research was carried out in April 2020 - April 2021 at the Laboratory of Plant Physiology, Culture and Microtechnics, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Brawijaya, and GC-MS analysis was carried out in the Chemistry laboratory of the University of Muhammadiyah Malang. The stages of research activities included callus induction and multiplication from seed explants, initiation and maintenance of cell suspension cultures, elicitation of suspension cultures with SA and MJ elicitors, and analysis of components and essential oil content in black cumin cell suspension cultures using GC-MS. Callus induction was carried out by culturing the seeds on MS + NAA 1 mg/L treatment media with various concentrations of kinetin (0; 0.5; 1; 2 and 3 mg/L) for five weeks. Callus formation and growth responses were evaluated after five weeks of culture. Callus from the best treatment was multiplied twice in subcultures to get callus crumbs and uniform. Cell suspension cultures were initiated and multiplied by transferring callus on MS + NAA 1 mg/L liquid medium + kinetin 2 mg/L. Cell suspension cultures were incubated in an incubator-shaker at 110 rpm under dark conditions at $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Growth curve of cell suspension culture for 14 days of culture as the basis for determining elicitation time. Evaluation of the growth of the cell suspension culture observed including Settled Cell Volume (SCV), Packed Cell Volume (PCV), fresh weight, dry weight, growth index, and cell viability. The components and levels of black cumin oil compounds in elicited cell suspension cultures were analyzed using the GC-MS method.

This study used a research design in the form of a randomized block design with two factors. The first factor is elicitor type (SA and MJ) and the second factor is elicitor concentration (0, 50, 100, 150, and 200 μM). The total treatment was 10 treatments with each treatment consisting of 10 replications. Quantitative data were analyzed using Analysis of Variance to determine the effect of elicitor (SA and MJ) and elicitor concentration on the growth of black cumin cell suspension culture. If there is a significant

difference between the factors, then it is continued using the Duncan Multiple Range Test ($\alpha = 0.05$) and the Independent sample T-test with 95% confidence.

The results of callus induction of black cumin seeds showed that the concentration of kinetin could significantly affect the growth of callus black cumin on callus emergence time, percentage of live explants, percentage of explants forming callus, and callus fresh weight. Callus induction medium MS + NAA 1 mg/L + kinetin 2 mg/L, in optimal callus growth with an average callus appearance time of 13 days, the percentage of live explants and the percentage of explants forming callus reached 84%, and the average callus fresh weight of each explant of 0.1699 grams.

Callus subculture 2 times in MS + NAA 1 mg/L + kinetin 2 mg/L media in callus crumbs which were very suitable for initiation of cell suspension culture. The results of measuring SCV in cell suspension culture for 14 days obtained a growth curve of cell suspension culture which includes the lag phase (days 0-2), exponential phase (days 3-9), and stationary phase (days 10-14). Giving elicitor SA and MJ in cell suspension culture for 14 days affected the growth of cell suspension culture. Two-way ANOVA results showed that SCV, PCV, fresh weight, dry weight, and growth index of black cumin cell culture were significantly affected by elicitor concentration but not influenced by elicitor type and the interaction between elicitor type and elicitor concentration. Meanwhile, cell viability is influenced by the interaction of the type and concentration of the elicitor. Giving elicitor on cell suspension culture media inhibited SCV, PCV, fresh weight, cell dry weight, and growth index. The higher the elicitor concentration of SA and MJ, the greater the inhibition of growth of the cell suspension culture. The SA elicitor caused more cell death than the MJ elicitor.

The number of black cumin oil components in black cumin seeds and control cell suspension culture was 71 and 70 components, respectively. The components of black cumin oil in the elicited cell suspension identified 71-74 components. The abundance of the main compounds of black cumin oil in cell suspension culture was higher than in seeds, namely Thymoquinone (4,700 and 4.722%), thymol (3,194 and 3,209%), β -pinene (3.265 and 3.280%), α -thujene (2,145 and 2.154%) and p -cymene (0.535 and 0.537%). The abundance of the main components in cell suspension cultures with the addition of SA and MJ elicitors was slightly lower than in seeds and cell suspension cultures without excitation. The content of thymoquinone in black cumin seeds (1266,614 $\mu\text{g/g}$ FW) was higher than that in the control suspension culture (1173,799 $\mu\text{g/g}$ FW). Elicitation with SA and MJ with a 25-100 μM concentration in cell suspension culture can increase the levels of thymoquinone compounds and 4 other main compounds of black cumin oil (thymol, β -pinene, α -thujene and p -cymene,), much higher than with on seeds. The levels of thymoquinone in cell suspension cultures elicited by MJ ranged from 1777.858 $\mu\text{g/g}$ FW and 2253.248 $\mu\text{g/g}$ FW, while those elicited with SA were 1143.288 $\mu\text{g/g}$ FW and 1705.346 $\mu\text{g/g}$ FW. Elicitation with MJ in cell suspension culture increased the content of the main compound of black cumin oil higher than SA. Elicitation of cell suspension culture with 100 μM salicylic acid was able to increase the content of the main compound of black cumin by 1.35 times compared to that from seeds, while MJ 100 μM was able to increase the concentration of the main compound of black cumin by 1.78 times compared to that of seeds.

Keywords: Salicylic acid, *Nigella sativa* L., Methyl jasmonate, Cell suspension culture, Thymoquinone

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Robbil ‘Aalamiin, dengan ungkapan rasa syukur pada Allah Yang Maha Kuasa akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang merupakan syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains dalam bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Ibu Dr. Dra. Wahyu Widoretno, M.Si. selaku Dosen Pembimbing I yang telah mendampingi dan memberi pengarahan serta tambahan ilmu dan saran-saran yang berguna bagi penulis.
2. Ibu Dra. Nunung Harijati, MS., PhD. selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberi pengarahan serta tambahan ilmu dan saran-saran yang berguna bagi penulis.
3. Ir. Retno Mastuti, M.Agr.Sc, D.Agr.Sc. dan Dr. Dra. Aminatun Munawarti, M.Si. selaku Dosen Penguji I dan Penguji II yang telah memberi saran yang bermanfaat demi perbaikan penyusunan tesis.
4. Orang tua penulis atas segala doa, dukungan, dan motivasi yang tidak terkira.
5. Rekan-rekan S2 Biologi Angkatan 2018 Genap, rekan-rekan laboratorium FKM Jurusan Biologi dan seluruh civitas akademik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Penulisan tesis ini merupakan upaya optimal penulis sebagai sarana terbaik dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini semakin bermanfaat.

Malang, Juli 2021

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN TESIS.....	ii
SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	iv
PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS	v
RIWAYAT HIDUP	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY.....	iiix
KATA PENGANTAR.....	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xivv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xvi
 BAB I PENDAHULUAN.....	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan	4
1.4 Manfaat	5
 BAB II KAJIAN PUSTAKA	 6
2.1 Tanaman Jintan Hitam (<i>Nigella sativa</i> L.).....	6
2.2 Struktur dan Biosintesis Senyawa Tymoquinone	7
2.3 Potensi Kultur Sel untuk Produksi Metabolit Sekunder	9
2.4 Strategi Elisitasi untuk Meningkatkan Produksi Metabolit Sekunder ..	11
2.5 Teknik Analisis Metabolit Sekunder	15
2.6 Kerangka Konsep.....	15
 BAB III METODE PENELITIAN	 18
3.1 Waktu dan Tempat.....	18
3.2 Kerangka Oprasional	18
3.3 Prosedur Penelitian	20
3.3.1 Pembuatan Media.....	20
3.3.2 Induksi dan Multiplikasi Kalus Jintan Hitam	20
3.3.3 Inisiasi dan Pemeliharaan Kultur Suspensi Sel.....	21
3.3.4 Elisitasi Kultur Suspensi Sel dengan Asam Salisilat dan Metil Jasmonat	21
3.3.5 Evaluasi Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Hasil Perlakuan Elisitasi	22
3.3.6 Analisis Profil dan Komponen Minyak Atsiri Jitan Hitam dengan GC-MS	23
3.4 Rancangan Percobaan	24
3.5 Analisa Data.....	24

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1 Pengaruh Konsentrasi Kinetin terhadap Induksi Kalus Biji Jintan Hitam	25
4.2 Pengaruh Elisitor Asam Salisilat dan Metil Jasmonat pada Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Jintan Hitam	28
4.3 Profil Komponen dan Kadar Minyak Atsiri Jintan Hitam pada Kultur Suspensi Sel Hasil Elisitasi dengan Asam Salisilat dan Metil Jasmonat	38
BAB V PENUTUP	53
5.1 Kesimpulan.....	53
5.2 Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	62

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Komponen kimia minyak jintan hitam hasil analisis GC-MS pada biji dan kultur suspensi sel.....	39
2.	Komponen kimia minyak jintan hitam hasil analisis GC-MS kultur suspensi sel hasil elisitasi dengan SA dan MJ	42

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Jintan hitam (<i>Nigella sativa</i> L.)	6
2.	Rumus bangun <i>thymoquinone</i>	7
3.	Jalur pembentukan geranyl diphosphate melalui MVA dan MEP <i>pathways</i> .	8
4.	Jalur biosintesis <i>thymoquinone</i>	9
5.	Skema peran pertahanan oleh SA pada tanaman yang mengalami cekaman .	12
6.	Model ilustrasi mekanisme pertahanan oleh pelukaan dan MJ eksogen	14
7.	Kerangka konsep	17
8.	Kerangka operasional	19
9.	Respon pertumbuhan kalus dari eksplan biji jintan hitam (<i>Nigella sativa</i> L.) pada media MS dengan penambahan NAA 1 mg/L dan berbagai konsentrasi kinetin setelah lima minggu kultur..	25
10.	Pengaruh beberapa konsentrasi kinetin yang dikombinasikan dengan NAA 1 mg/L terhadap induksi kalus biji jintan hitam (<i>Nigella sativa</i> L.).....	26
11.	Kurva pertumbuhan kultur suspensi sel jintan hitam pada media cair MS + NAA 1 mg/L + Kinetin 2 mg/L selama 14 hari kultur.	28
12.	Viabilitas sel pada kultur suspensi sel jintan hitam pada media cair dengan penambahan elisitor asam salisilat setelah 10 hari kultur.....	29
13.	Viabilitas sel kultur suspensi sel jintan hitam pada media cair dengan penambahan elisitor MJ setelah 10 hari kultur	30
14.	Pengaruh pemberian elisitor SA dan MJ terhadap volume endapan sel (SCV) kultur suspensi sel jintan hitam (<i>Nigella sativa</i> L.).....	31
15.	Pengaruh pemberian elisitor SA dan MJ terhadap volume sel setelah sentrifugasi (PCV) kultur suspensi sel jintan hitam (<i>Nigella sativa</i> L.)	32
16.	Pengaruh pemberian elisitor SA dan MJ terhadap pertumbuhan kultur suspensi sel jintan hitam (<i>Nigella sativa</i> L.) setelah 10 hari kultur.....	33
17.	Kromatogram komponen senyawa minyak biji jintan hitam dan kultur suspensi sel kontrol.....	38
18.	Kelimpahan komponen utama minyak atsiri pada kultur suspensi sel jintan hitam hasil perlakuan elisitasi.....	44
19.	Kadar komponen utama minyak atsiri pada kultur suspensi jintan hitam hasil perlakuan elisitasi.....	45
20.	Perbandingan kadar <i>thymoquinone</i> pada biji jintan hitam, kultur suspensi sel (kontrol) dan kultur suspensi sel hasil elisitasi dengan SA dan MJ	46
21.	Grafik korelasi antara indeks pertumbuhan dan viabilitas sel dengan kadar senyawa <i>thymoquinone</i> pada kultur suspensi jintan hitam perlakuan SA dan MJ.	47

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1.	Komposisi dan Standar Penimbangan Stok Medium Dasar MS	62
2.	Pembuatan dan Pengambilan Stok Elisitor.....	63
3.	Data dan Analisis ANOVA Induksi Kalus Biji Jintan Hitam	65
4.	Data SCV Pengamatan Kurva Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Jintan Hitam selama 14 hari Kultur	67
5.	Data dan Analisis ANOVA Pertumbuhan Sel Jintan Hitam setelah Perlakuan Elisitasi	68
6.	Hasil Analisis <i>Independent-sample T-test</i>	74
7.	Hasil Analisis GC-MS Suspensi Sel Jintan Hitam setelah Perlakuan Elisitasi	77
8.	Kuantifikasi komponen utama minyak atsiri jintan hitam	80
9.	Perhitungan kuantifikasi komponen utama minyak atsiri jintan hitam	90
10.	Sertifikat Bebas Plagiasi.....	92

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry
MS	Murashige & Skoog
NAA	Naphthaleneacetic acid
MJ	<i>Methyl Jasmonate</i> / metil jasmonat
JA	<i>Jasmonic acid</i> / asam jasmonat
SA	<i>Salicylic acid</i> / asam salisilat
HCl	Hydrochloric acid
NaOH	Sodium hydroxide
P ₂ O ₅	Difosforus pentaoksida
MVA	<i>Mevalonat acid</i>
MEP	<i>methylethritol phosphate</i>
DXP	<i>1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate</i>
NaOCl	Sodium hipoklorit
LAF	<i>Laminar Air Flow</i>
SCV	<i>Settled Cell Volume</i>
PCV	<i>Packed Cell Volume</i>
BB	Berat basah
BK	Berat kering
IP	Indeks pertumbuhan
g/L	gram per liter
cm	centimeter
mg/L	miligram per liter
mM	milimolar
μM	mikromolar
kg	kilogram
mg/kg	milligram per kilogram
mm	millimeter
rpm	revolutions per minute
kg/ha	kilogram per hektar
μg/g BB	mikrogram per gram berat basah
mg/g BK	miligram per gram berat kering
<u>Simbol</u>	<u>Nama Unit</u>
α	alfa
β	beta
γ	gamma
ρ	rho
\$	dolar
%	persen
°C	derajat celcius

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman Jintan hitam (*Nigella sativa* L.) merupakan tanaman semusim, termasuk famili Ranunculaceae. Jintan hitam merupakan tanaman memiliki biji yang kecil dan diyakini masyarakat di wilayah Mediterania sebagai obat tradisional. Biji jintan hitam telah digunakan selama berabad-abad untuk pengobatan berbagai macam penyakit, termasuk penyakit menular yang menjadikannya salah satu obat penting dari *Tibbe Nabawi* (Pengobatan Nabi) (Chaudhry dkk., 2014a). Biji jintan hitam mengandung berbagai senyawa bioaktif untuk tujuan pengobatan selain digunakan sebagai pelengkap bumbu masak (Setiawati dkk., 2018). Jintan hitam menempati tempat utama dalam budidaya tanaman di Asia Tenggara dan Asia selatan, hal ini disebabkan biji jintan hitam semakin banyak digunakan dalam dunia medis (Bourgou dkk., 2008).

Kandungan utama yang terdapat pada biji jintan hitam adalah dari golongan minyak atsiri dengan kandungan sebesar 0,5-1,6% terutama terdiri dari monoterpen; *p-cymene*, *γ-terpinene*, *α-pinene*, *β-pinene*, *α-thujene*, *carvacrol*, *thymol*, *thymohydroquinone*, *dithymoquinone* dan *thymoquinone* (Burits dan Bucar, 2000; Venkatachallam dkk., 2010). Salah satu minyak atsiri jintan hitam yakni *Thymoquinone* yang bersifat non polar dari golongan monoterpen yang merupakan senyawa paling banyak terdapat pada minyak atsiri biji jintan hitam sekitar 7,8-13,7% (Botnick dkk., 2012). *Thymoquinone* berfungsi sebagai antimikroba, antiparasit, antikanker, antiinflamasi, imunomodulator, antioksidan dan hepatoprotektor. Potensi senyawa *thymoquinone* dan molekul turunannya yang terkandung dalam biji jintan hitam ini bermanfaat sebagai agen antikanker (Gali-Muhtasib dkk., 2006). Selain itu, *thymoquinone* berguna untuk mencegah penyakit kanker usus dan leukeimia (Norsharina dkk., 2011).

Indonesia memenuhi kebutuhan jintan hitam dalam negeri selama ini masih dengan cara mengimpor dari Negara Iran, India, Maroko, Mesir dan negara Timur Tengah lainnya. Total impor jintan hitam oleh Indonesia meningkat dari tahun 2015 hingga 2016. Nilai total impor biji jintan hitam yang dilakukan oleh Negara Indonesia meningkat dari tahun ketahun, contohnya pada tahun 2015 sebanyak 2,2 ribu ton dengan nilai US\$ 2,19 juta meningkat pada tahun 2016 menjadi 2,4 ribu ton dengan US\$ 2,63 juta (BPS, 2016). Umumnya biji jintan hitam banyak dijual dalam bentuk serbuk maupun dalam bentuk

ekstrak biji yang berupa minyak atsiri yang dikemas dalam kapsul yang dikenal dengan nama produk kapsul "*Habbatussauda*" dan banyak dijumpai di pasaran.

Tanaman jintan hitam merupakan tanaman daerah subtropis sehingga untuk penanaman di daerah tropis seperti di Indonesia memerlukan adaptasi lingkungan yang cukup lama untuk dapat hidup dan produktif. Upaya untuk meningkatkan produksi biji jintan hitam ada banyak, salah satunya adalah dengan perlakuan media tanam. Perlakuan media campuran tanah, pupuk kandang dan arang sekam menghasilkan produksi biji sebanyak 58.9 kg/ha (Mardisiwi, 2017). Produksi jintan hitam dapat ditingkatkan dengan aplikasi pupuk N dan P anorganik, hasil pemupukan 120 kg N/ha + 157 kg P₂O₅/ha menghasilkan produksi biji jintan hitam tertinggi yaitu 363,04 kg/ha (Suryadi, 2014). Produksi tersebut belum dapat memenuhi kebutuhan Jintan hitam dalam negeri serta masih sangat rendah jika dibandingkan negara asalnya. Produksi jintan hitam di Iran mencapai 1403-2075 kg/ha, di Turki 509-575 kg/ha dan di Pakistan 526-1720 kg/ha (Hussain dkk., 2009; Ghamarnia dkk., 2010; Tuncturk dkk., 2012).

Kandungan senyawa *thymoquinone* pada biji jintan hitam yang diuji dari berbagai negara juga berbeda-beda, contohnya kandungan *thymoquinone* dari negara Arab Saudi 0,225%, India 0,236%, Syria 0,137 %, Sudan 0,127% dan Etiopia 0,309%. Kandungan *thymoquinone* dari hasil budidaya di Indonesia masih sangat kecil jika dibandingkan dengan di negara-negara beriklim subtropis, kandungan *thymoquinone* dari hasil budidaya di Indonesia hanya mencapai 0.063% (Suryadi, 2016). Selain faktor produksi dan kadar *thymoquinone* yang rendah, faktor lain seperti ketersediaan yang fluktuatif sepanjang tahun (musiman), penurunan kandungan metabolit sekunder yang cepat, kualitas produk yang tidak konsisten dan degradasi senyawa metabolit sekunder akibat proses penyimpanan yang terlalu lama dapat menurunkan kandungan metabolit sekunder (Lila, 2004; Ram dkk., 2013), hal tersebut merupakan faktor yang perlu diperhatikan pada komoditas biji jintan hitam.

Teknik kultur sel dapat digunakan sebagai teknik alternatif untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder jintan hitam. Keunggulan penggunaan teknik kultur sel adalah metabolit sekunder yang dihasilkan lebih cepat, efisien, praktis, kondisi lingkungan terkontrol dan mudah diproduksi secara berkala (Vanisree dkk., 2004). Kultur suspensi sel menjadi salah satu alternatif untuk meningkatkan kadar metabolit sekunder pada jintan hitam. Kultur suspensi sel tanaman dilaporkan lebih cepat dalam produksi metabolit sekunder skala besar dalam bioreaktor (Mustafa dkk., 2011). Kultur sel tanaman telah digunakan untuk produksi metabolit sekunder seperti alkaloid dan isoflavon (Zhao dkk.,

2001; Sansanelli dkk., 2014). Produksi metabolit sekunder dapat ditingkatkan dengan beberapa cara, yaitu memanipulasi nutrisi media tumbuh, zat pengatur tumbuh, prekursor dan teknik elisitasi untuk sintesis metabolit sekunder (Zhao dkk., 2005). Elisitasi merupakan suatu teknik yang mengacu pada fenomena alam dalam mekanisme pertahanan tumbuhan terhadap cekaman maupun patogennya. Interaksi antara patogen dengan tumbuhan inang yang menginduksi pembentukan fitoaleksin pada tumbuhan merupakan respon terhadap serangan mikroba patogen (Vasconsuelo dan Boland, 2007).

Senyawa yang berperan dalam proses elisitasi disebut elisitor. Elisitor mengaktifkan gen dalam tumbuhan yang mengkode enzim yang diperlukan untuk sintesis fitoaleksin. Elisitor selain menginduksi pembentukan fitoaleksin juga meningkatkan berbagai metabolit sekunder dan enzim lain. Pada kultur kalus dan kultur sel penambahan elisitor juga dapat menginduksi senyawa metabolit sekunder yang bukan fitoaleksin (Habibah, 2009). Elisitor merupakan senyawa atau ion-ion dalam bentuk fisik, kimiawi maupun biologis yang dapat meningkatkan produksi senyawa metabolit sekunder sebagai respon pertahanan tumbuhan (Zulhilmi dkk., 2012).

Asam salisilat dan metil jasmonat merupakan elisitor abiotik yang banyak digunakan untuk meningkatkan metabolit sekunder. Asam salisilat (SA) memainkan peran sentral dalam mekanisme pertahanan tanaman terhadap patogen (Durner dkk., 1997). Asam salisilat bertindak sebagai fitohormon dan dapat mempertahankan kadar auksin dan sitokinin dalam jaringan tanaman, meningkatkan pembelahan sel dan berat kering sel (Sakhabutdinova dkk., 2004; Hayat dkk., 2010). Pemberian SA juga dapat mempengaruhi produksi senyawa terpenoid dari jalur MEP di plastid dan jalur MVA di sitosol, telah terbukti diregulasi secara transkripsi oleh SA pada tanaman *Salvia miltiorhiza*, *Michelia chapensis* dan pada spesies-spesies yang berbeda juga (Tounekti dkk., 2013).

Asam jasmonat (JA) dan metil esternya, metil jasmonat (MJ), telah diusulkan menjadi senyawa pensinyalan penting dalam proses elisitasi yang mengarah ke hiperproduksi berbagai metabolit sekunder (Walker dkk., 2002). Senyawa MJ adalah senyawa alami yang disintesis oleh tumbuhan sebagai respon terhadap adanya serangan patogen. Senyawa ini merupakan senyawa pengatur penting yang mempengaruhi respon dan signal tumbuhan yang bekerja dalam penghambatan atau aktivasi suatu hubungan (Orbán dkk., 2008). Mereka juga telah dilaporkan memainkan peran kunci dalam proses transduksi sinyal yang mengatur respons pertahanan pada tanaman dan menunjukkan efektivitas untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder dalam kultur sel (Zhao dkk., 2010). Hal ini menjadi dasar penggunaan asam jasmonat dan derivatnya dalam penelitian ini

menggunakan metil jasmonat sebagai elisitor pada berbagai kultur in vitro tanaman dalam rangka peningkatan produksi metabolit sekunder.

Penggunaan elisitor SA dalam media cair pada kultur suspensi sel *Hypericum perforatum* L. diberikan pada akhir fase eksponensial. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan SA dengan konsentrasi 100 μM dapat meningkatkan kandungan *Hypericin* dan *Pseudohypericin* masing-masing sebanyak 2.5 kali lipat dan 2.33 kali lipat dari kontrol (Gadzovska dkk., 2012). Pada penelitian lain juga melaporkan bahwa kultur suspensi sel *Vitis vinifera* L. yang diberi perlakuan MJ pada konsentrasi 100 μM diperoleh kandungan *stilbene* meningkat sebanyak 2,34 kali lipat lebih tinggi dibandingkan kontrol (Xu dkk., 2015). Selain itu, pengaruh pemberian MJ 50 μM dan SA 250 μM pada kultur suspensi sel tanaman *Celastrus paniculatus* dapat meningkatkan total fenolik sebanyak masing-masing 30 kali dan 19 kali dari sel kontrol (Anusha dkk., 2016).

Penelitian ini menggunakan metode manipulasi media tumbuh pada kultur suspensi sel untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder dengan teknik elisitasi menggunakan asam salisilat dan metil jasmonat. Metode ini diharapkan dapat meningkatkan senyawa metabolit sekunder *thymoquinone* yang terkandung dalam kultur suspensi sel jintan hitam yang dapat bermanfaat di bidang kesehatan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

- 1 Bagaimana pengaruh konsentrasi kinetin yang dikombinasikan dengan NAA terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus biji jintan hitam secara *in vitro*?
- 2 Bagaimana pengaruh elisitor asam salisilat dan metil jasmonat terhadap pertumbuhan kultur suspensi sel jintan hitam secara *in vitro*?
- 3 Bagaimana pengaruh elisitor asam salisilat dan metil jasmonat terhadap komponen dan kandungan senyawa *thymoquinone* pada kultur suspensi sel jintan hitam?

1.3 Tujuan

Tujuan dalam penelitian ini adalah:

- 1 Untuk mengevaluasi pengaruh konsentrasi kinetin yang dikombinasikan dengan NAA terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus biji jintan hitam secara *in vitro*.
- 2 Untuk mengevaluasi pengaruh elisitor asam salisilat dan metil jasmonat terhadap pertumbuhan kultur suspensi sel jintan hitam secara *in vitro*.

- 3 Untuk mengevaluasi pengaruh elisitor asam salisilat dan metil jasmonat terhadap komponen dan kandungan senyawa *thymoquinone* pada kultur suspensi sel jintan hitam.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah diperoleh informasi tentang profil dan komponen senyawa minyak jintan hitam pada kultur suspensi sel serta metode alternatif yang efisien untuk produksi minyak jintan hitam melalui teknik kultur sel, sehingga dapat membantu mengatasi kekurangan ketersediaan minyak jintan hitam Nasional yang bermanfaat dalam bidang kesehatan.

BAB II KAJIAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.)

Tanaman Jintan Hitam atau *Black Seed* (Inggris) sering disebut juga dengan *Habattusauda* (Arab) merupakan tumbuhan berbunga yang berasal dari Asia Barat Daya. *Nigella sativa* merupakan tumbuhan asli daerah mediterania, namun juga telah banyak tumbuh di belahan dunia lain, yang meliputi Arab Saudi, Afrika Utara, dan sebagian Asia (Hosseinzadeh dkk., 2010). Tumbuhan ini tumbuh hingga mencapai tinggi 20-30 cm, dengan daun hijau lonjong, ujung dan pangkal runcing, tepi beringgit dan pertulangan yang menyirip. Bunganya majemuk, bentuk karang, kepala sari berwarna kuning, mahkota berbentuk corong berwarna biru pucat dan putih dengan 5-10 kelopak bunga dalam satu batang pohon (Gambar 2.1 A). Bunga jintan hitam di daerah alaminya berwarna kebiruan dengan jumlah kelopak yang bervariasi. Gynosium terdiri dari sejumlah karpel, berkembang menjadi folikel setelah terjadi penyerbukan, dengan buah tunggal sebagian terhubung untuk membentuk struktur seperti kapsul (Belgaumi dkk., 2020).



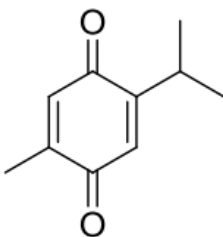
Gambar 1. Tanaman jintan hitam (*Nigella sativa* L.)

Keterangan: (A) bunga, (B) buah atau kapsul dan (C) biji (Yusuf 2014).

Buah jintan hitam termasuk kedalam buah kotak sejati (kapsul) yang mempunyai ruangan (folikel) yang jumlahnya sesuai dengan banyaknya tangkai putik pada bunga. Kapsul terdiri atas tangkai kapsul, kapsul dan putik yang mengering. Tangkai kapsul berukuran panjang antara 5-6 cm, lebar kapsul antara 0,6-0,8 cm dan panjang kapsul hingga 1,3-1,5 cm. Bagian dalam kapsul terdapat 3-6 ruang folikel yang berisi biji jintan hitam 40-70 biji/kapsul. Biji jintan hitam berbentuk lonjong dengan ukuran panjang 2,76-3,10 mm dan lebar 1,54-1,87 mm (Gambar 2.1 C). permukaan biji berwarna hitam memiliki ketebalan kulit biji 0,34-0,36 mm dengan lembaga biji yang berwarna putih. Berat 100 biji adalah 0,26-0,28 gram (Suryadi, 2014).

2.2 Struktur dan Biosintesis Senyawa Thymoquinone

Senyawa *thymoquinone* adalah senyawa bioaktif dari golongan terpenoid yaitu monoterpen yang merupakan salah satu senyawa paling banyak terdapat pada minyak esensial biji jintan hitam yaitu sekitar 7,8-13,7% (Botnick dkk., 2012). Hasil penelitian terdahulu dilaporkan bahwa kandungan *thymoquinone* dari tiap negara berbeda-beda, yaitu dari Ethiopia 3,099 mg/kg, India 2,363 mg/kg, Saudi Arabia 2,251 mg/kg, Syria 1,372 mg/kg dan Sudan 1,275 mg/kg (Al-Saleh dkk., 2006). Rumus bangun *thymoquinone* disajikan pada Gambar 2.



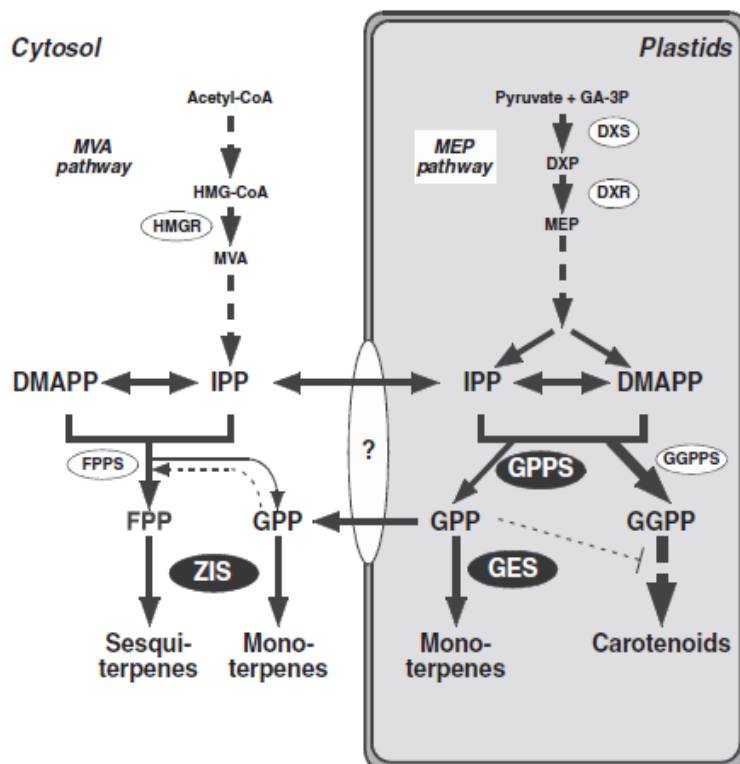
Gambar 2. Rumus bangun *thymoquinone* (Khan dan Afzal, 2016)

Thymoquinone berfungsi sebagai anti-mikroba, anti-parasit, anti-kanker, anti-inflamasi, imunomodulator, anti-oksidan dan hepatoprotektor (Gali-Muhtasib dkk., 2006). Selain itu, *thymoquinone* berguna untuk mencegah penyakit kanker usus dan leukeumia (Norsharina dkk., 2011), anti-mikroba (Chaieb dkk., 2011) dan mencegah kerusakan eritrosit yang disebabkan oleh 1,2-dimethylhydrazine (Harzallah dkk., 2012). Manfaat farmakologis lainnya yang telah diuji pada senyawa *thymoquinone* antara lain sebagai obat diabetes mellitus (El-Mahmoudy dkk., 2005), asma-bronkial (Al-Majed dkk., 2001), schistosomiasis (Aboul-Ela 2002), hiperglikemia (Hawsawi dkk., 2001), peroksidasi lipid (Meral dkk., 2001; Mansour dkk., 2002; El-Saleh dkk., 2004), *multiple-sclerosis* (Mohamed dkk., 2003), darah tinggi (Bamosa dkk., 2002), colitis ulseratif (Mahgoub 2003) dan cedera mukosa lambung (El-Abhar dkk., 2003).

Senyawa golongan terpenoid disintesis melalui kondensasi unit isoprena aktif yang disebut isopentenil pirofosfat (IPP) dan dimetilalil pirofosfat (DMAPP). Pada awal penemuan jalur asam mevalonat, diterima secara luas bahwa IPP dan DMAPP dibentuk hanya melalui jalur ini di semua organisme hidup. Pada tumbuhan, biosintesis isoprena dapat disintesis melalui jalur mevalonat/*mevalonic acid* (MVA) maupun jalur 1-Deoksi-D-xilulosa-5-fosfat (DXP) atau biasa disebut juga dengan jalur Metileritrotol-posphat (MEP) (Gambar 3). Jalur DXP/MEP tidak terjadi pada sitosol ataupun retikulum endoplasma pada sel seperti halnya jalur biosintesis jalur mevalonat, akan tetapi terjadi pada plastida dan

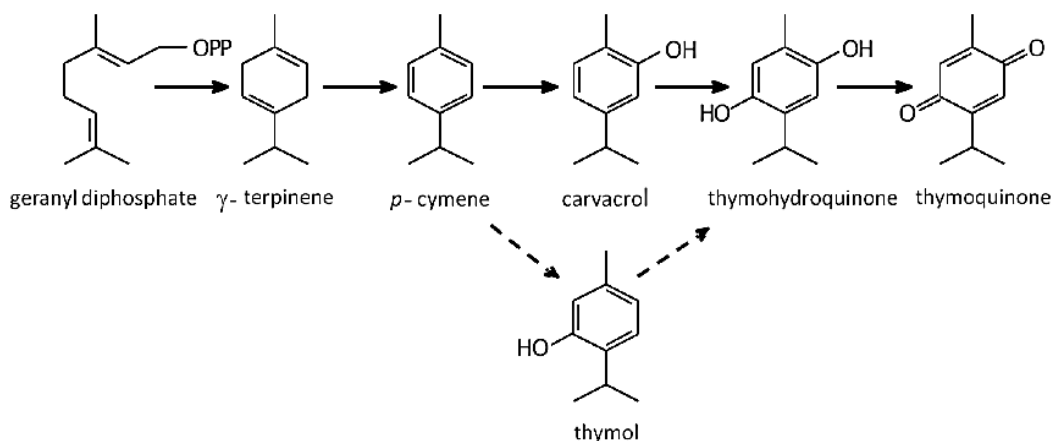
menghasilkan monoterpen, triterpen maupun karotenoid (Kuzuyama dan Seto, 2003). Biosintesis isoprena melalui jalur DXP/MEP ini dibagi ke dalam enam tahapan reaksi. Pada tumbuhan umumnya menggunakan 1-deoksi-D-silulosa (DX). DX akan diubah menjadi DXP dengan bantuan enzim D-silulokinase yang disandi oleh gen *xylB*. Selanjutnya akan terjadi pembentukan DXP dari rekasi kondensasi asam piruvat dan tiamina pirofosfat (TPP) serta D-glyseraldehida 3-fosfat yang dikatalisasi oleh enzim DXP-sintase. DXP-sintase disandi oleh gen *dxs* (Lois dkk., 1998).

Biosintesis senyawa terpen jalur MVA secara garis besar dapat dibagi ke dalam empat tahapan proses yang meliputi biosintesis prekursor dasar untuk pembentukan isopentenil pirofosfat (IPP), kedua adalah penambahan IPP secara repetitif membentuk prekursor perantara untuk berbagai macam kelas terpenoid, tahap ketiga adalah elaborasi alilik prenil difosfat oleh enzim terpenoid sintase yang spesifik untuk menghasilkan kerangka karbon dari terpenoid itu sendiri, dan yang terakhir, modifikasi kerangka karbon secara enzimatik untuk menghasilkan diversitas struktur dan aktivitas biologinya sebagai senyawa bahan alam. Beberapa data memperlihatkan bahwa proses biosintesis isoprena jalur *mevalonat pathway* lebih aktif terjadi pada sitosol dan retikulum endoplasma (ER) untuk menghasilkan monoterpen, seskuiterpen dan diterpen (Croteau dkk., 2000).



Gambar 3. Jalur pembentukan *geranyl diphosphate* melalui MVA dan MEP pathways (Gutensohn dkk., 2013).

Isopentenil pirofosfat (IPP) dengan bantuan enzim IPP isomerase akan membentuk reaksi kesetimbangan menjadi dimetilalil-pirofosfat (DMAPP). Kondensasi IPP dan DMAPP yang akan membentuk geranilpirofosfat (GPP, C-10) monoterpen dan farnesil-pirofosfat (FPP, C-15) seskuiterpen yang dikatalisasi secara berturut-turut oleh geranilpirofosfat sintase dan farnesilpirofosfat sintase (Burke dkk., 1999). *Thymoquinone* merupakan produk metabolisme sekunder yang terbentuk dari prekursor *geranyl diphosphate* (GPP) yang mampu membentuk γ -*terpinene* melalui siklisasi sebelum membentuk *p*-*cymene* melalui aromatisasi dan diikuti dengan menghasilkan *carvacrol* atau *thymol* melalui hidroksilasi. Pembentukan *thymohydroquinone* terjadi oleh hidroksilasi lain sebelum berubah menjadi *thymoquinone* melalui oksidasi, sedangkan hidroksilasi *thymol* sebagai jalur biosintesis alternatif (Gambar 4). *Thymoquinone* juga dapat membentuk *dithymoquinone* dan produk oligokondesasi yang lebih tinggi saat disimpan (Bouwmeester dkk., 1998; Suryadi, 2014).



Gambar 4 Jalur biosintesis *thymoquinone* (Botnick dkk., 2012)

2.3 Potensi Kultur Sel untuk Produksi Metabolit Sekunder

Kultur jaringan tanaman adalah teknik yang memanipulasi pertumbuhan sel atau jaringan tanaman dalam gelas (*in vitro*) dengan penambahan media tanam yang mengandung nutrisi lengkap yang diperlukan dalam kondisi steril. Botol kaca maupun plastik yang berisi media dan bahan tanaman dipelihara dalam ruang inkubasi dengan suhu yang terkontrol dan diberi cahaya sesuai dengan kebutuhan tanaman (Sathyanarayana dan Verghese, 2007). Teknologi kultur jaringan tanaman dapat memberikan cara terbaik untuk memperbanyak tanaman dengan kualitas tinggi, tanaman bebas penyakit serta produksi jumlah besar dengan waktu yang singkat dibandingkan metode budidaya atau pemuliaan

secara tradisional yang dapat memakan waktu hingga 10-15 tahun (Shnaishel, 2019). Kultur jaringan tanaman dapat dimulai dari hampir semua bagian tanaman, untuk budidaya mikro atau regenerasi pucuk langsung, jaringan meristemetik seperti ujung pucuk sangat ideal. Keadaan fisiologis tanaman memang memiliki pengaruh pada responsnya terhadap kultur jaringan. Seperti eksplan ujung pucuk yang masih muda mengandung lebih banyak sel-sel yang aktif membelah. Pemilihan tanaman penting untuk menggunakan stok tanaman induk berkualitas untuk memulai kultur jaringan (Bhoite dan Palshikar, 2014).

Keterbatasan kesediaan benih tanaman pada waktu yang tepat, yang membutuhkan waktu untuk mendapatkannya, serta beberapa benih mulai memburuk karena paparan bio-stres sehingga teknologi kultur jaringan tanaman memberikan cara alternatif untuk meningkatkan produksi bibit tanaman dan metabolit sekunder tanaman. Bagian jaringan sering digunakan sebagai daun, batang dan biji dan setiap bagian tanaman dapat digunakan untuk keperluan kultur jaringan. Berbagai bahan seperti pengatur tumbuh dan agar digunakan untuk memfasilitasi proses ini. Kultur jaringan diterapkan untuk penelitian tanaman untuk berbagai keperluan seperti perbanyakan tanaman, produksi tanaman bebas penyakit dan produksi senyawa metabolit sekunder tanaman (Baday, 2019).

Jaringan kalus merupakan massa sel yang tidak berdiferensiasi dan dapat menjadi remah atau kompak. Kalus remah terdiri dari sel-sel yang mudah pecah dan tidak menunjukkan regenerasi organ yang jelas, sedangkan kalus kompak terdiri dari sel-sel bertekstur keras dan padat. Beberapa kultur kalus menunjukkan regenerasi organ dengan struktur mirip akar dan pucuk yang berkembang pada massa kalus (Ramulifho dkk., 2019). Kultur jaringan umumnya menggunakan bahan-bahan tanam/eksplan yang relatif kecil, jaringan yang terluka hasil sayatan untuk memperkecil eksplan dapat pulih dengan pertumbuhan sel-sel kalus yang tidak berdiferensiasi di daerah luka. Sel-sel kalus ini dapat dikultur *in vitro* untuk aplikasi bioteknologi. Eksplan yang diambil dari jaringan tanaman perlahan-lahan tumbuh secara *in vitro* menjadi massa sel yang berkisar dari amorf dan tidak berwarna sampai coklat pucat. Sel kalus mirip dengan sel meristemik yang tidak berdiferensiasi. Kultur kalus biasanya tumbuh pada $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$. Kalus dapat dibedakan antara kalus yang berbentuk semi-kompak dan remah (Efferth, 2019).

Kultur suspensi sel membutuhkan kalus dengan tekstur remah sebagai bahan kultur atau eksplannya. Selanjutnya kalus disuspensikan dalam media cair yang mengandung berbagai nutrisi dan senyawa-senyawa yang dibutuhkan untuk pertumbuhan optimal yang menyebabkan sel menjadi tidak terdiferensiasi. Kultur suspensi sel tersebut selanjutnya diletakkan di atas alat *shaker* (mesin penggoyang/pemutar) yang menyebabkan agregat sel

menjadi kumpulan agregat kecil dan sel tunggal yang tersebar merata dalam media cair (Hutami, 2016). Kultur suspensi sel dapat dipindahkan dalam media yang mengandung hormon yang dapat mengaktifkan pertumbuhan spesifik. Misalnya media yang mengandung auksin, dapat mengaktifkan pertumbuhan akar-akar adventif, sedangkan media yang mengandung sitokinin dapat memacu proliferasi tunas aksilar dan tunas adventif dan mengatur diferensiasi. Setelah tanaman berkembang sempurna, selanjutnya dapat dipindahkan ke tanah untuk tumbuh lebih lanjut (George dkk., 2008).

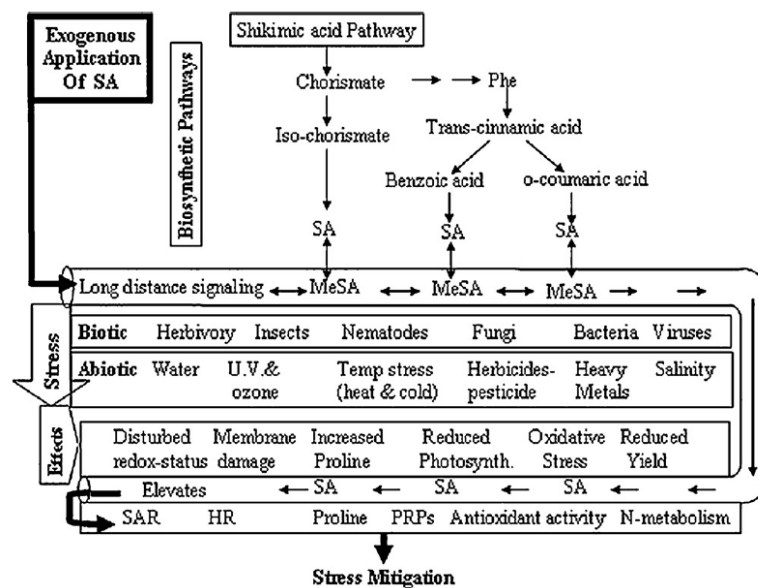
Metabolit sekunder pada kultur kalus maupun kultur sel umumnya meningkat pada fase stasioner. Hal ini dimungkinkan karena adanya peningkatan atau akumulasi vakuola makanan dalam sel. Pada fase stasioner pertumbuhan terhenti dan terjadi fase kematian sel, hal ini karena sejumlah nutrisi telah berkurang atau menjadi akumulasi senyawa toksik yang dikeluarkan kalus dalam medium. Pada fase ini harus dilakukan subkultur agar kalus maupun kultur suspensi sel tetap hidup (Darwati, 2007). Peranan penambahan auksin dan sitokinin dalam medium dapat mengontrol pembelahan dan diferensiasi kalus dan sitokinin dapat merangsang laju sintesis protein dan menghambat pembesaran sel, sehingga mempengaruhi keseimbangan antara pembelahan sel, ekspansi sel, dan produktifitas senyawa metabolit sekunder (Khanpour-Ardestani dkk., 2015).

2.4 Strategi Elisitasi untuk Meningkatkan Produksi Metabolit Sekunder

Teknik yang telah banyak diteliti untuk meningkatkan senyawa kandungan metabolit sekunder diantaranya melalui amobilisasi, modifikasi media, dan juga elisitasi. Elisitasi adalah suatu metode untuk meningkatkan fitoaleksin dan metabolit sekunder lainnya dengan menambahkan berbagai elisitor, baik berupa faktor biotik maupun abiotik (Buitelaar dkk., 1992). Produksi senyawa bioaktif melalui kultur jaringan dapat ditingkatkan dengan elisitasi. Elisitasi merupakan metode yang mengacu pada fenomena alam dalam mekanisme pertahanan inang terhadap patogennya. Interaksi antara patogen dengan tumbuhan inang yang menginduksi pembentukan fitoaleksin pada tumbuhan merupakan respon terhadap serangan mikroba patogen (Vasconsuelo dan Boland, 2007).

Salisilat memegang peranan penting dalam ketahanan sistemik terinduksi. Asam salisilat digunakan pada tanaman sebagai reaksi terhadap infeksi patogen dan sebagai racun murni pada penyakit layu *Fusarium*. Mekanisme ketahanan tanaman terhadap penyakit dapat berupa ketahanan secara fisik maupun kimia. Salah satu bentuk ketahanan secara kimia adalah asam salisilat. Asam salisilat lebih dominan untuk mengatasi serangan patogen biotrof (patogen yang aktif pada jaringan hidup) dan virus (Afkar dkk., 2019).

Asam salisilat adalah fitohormon fenolik dan dianggap sebagai elisitor kimia yang efisien. Senyawa ini terlibat dalam sistem sinyal dalam tumbuhan, dapat menginduksi enzim untuk mengkatalisasi pembentukan pertahanan senyawa seperti polifenol dan alkaloid (Van Loon, 1997). Asam salisilat berperan dalam pensinyalan dan regulasi ekspresi gen dalam penuaan daun di *Arabidopsis*. Asam salisilat bertindak sebagai molekul pensinyalan dan mengatur bio-produktivitas, pertumbuhan, fotosintesis, kadar air dalam tanaman, berbagai aktivitas enzim dan pengaruhnya terhadap tanaman yang terpapar berbagai cekaman biotik maupun abiotik (Hayat dkk., 2010).



Gambar 5 Skema peran SA terhadap mekanisme pertahanan pada tanaman yang mengalami cekaman (Hayat dkk., 2010)

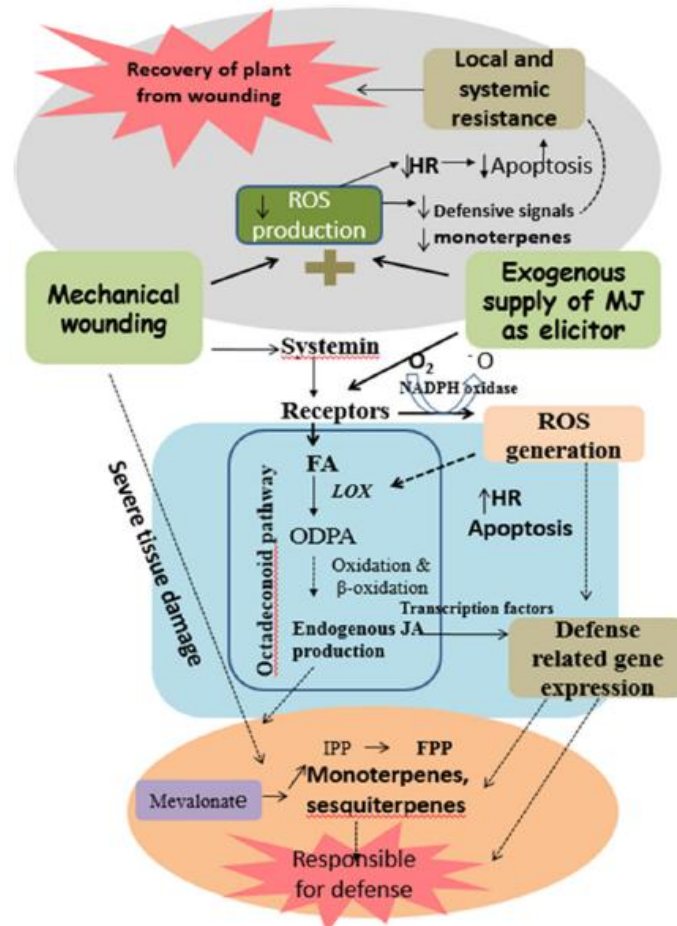
Asam salisilat bergerak dari organ tanaman yang terinfeksi ke yang tidak terinfeksi melalui floem dan dapat melewati lapisan kutikula yang keras dalam bentuknya yang dimetilasi disebut metil salisilat yang membuatnya mampu berdifusi melintasi kutikula yang bebas dari pH (Niederl dkk., 1998). Metil salisilat / MeSA adalah molekul pensinyalan jarak jauh yang mudah menguap yang bergerak dari yang terinfeksi ke jaringan yang tidak terinfeksi melalui floem. MeSA mewakili prekursor SA yang tidak aktif yang dapat ditranslokasi dan dikonversi menjadi asam salisilat saat diperlukan. Metil salisilat / MeSA diproduksi dari SA pada tanaman tembakau, setelah infeksi dan menginduksi respon pertahanan dengan kembali ke SA. Selanjutnya, tingkat MeSA dalam jaringan tanaman juga paralel dengan peningkatan konsentrasi SA secara lokal dan sistemik setelah infeksi virus atau bakteri, namun senyawa MeSA tidak memiliki efek langsung pada induksi respon pertahanan pada tanaman (Seskar dkk., 1998).

Kandungan asam salisilat dalam sel diatur oleh dua enzim yang berperan penting dalam mengontrol keseimbangan antara SA dan MeSA: SA-bindingprotein2/ Metiltransferase (SABP2/MES) yang mengubah MeSA yang tidak aktif secara biologis menjadi SA aktif dan enzim SA-metiltransferase (SAMT) yang mengubah SA menjadi MeSA (Forouhar dkk., 2005). Metil salisilat ini berfungsi sebagai sinyal SAR jarak jauh yang penting dalam tembakau. Aktivitas enzim SABP2 sangat penting untuk pensinyalan SAR di jaringan distal (Park dkk., 2007). Sebuah model yang menunjukkan pemberian asam salisilat (SA) secara eksogen diterima oleh MeSA dan terjadi peningkatan SA endogen yang menyebabkan terjadinya system pertahanan sistemik terhadap cekaman (Gambar 5). Asam salisilat disintesis baik dari jalur *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) atau dari jalur *Isochorismate Synthase* (ICS/SID2). Glucosyltransferases (SAGTs) asam salisilat mengkatalisis konversi SA menjadi SA 2-O- β -Dglucoside (SAG) dan ester glukosa salisilat (SGE). Senyawa SA endogen terakumulasi selama serangan patogen dan dikonversi menjadi MeSA oleh SAMT. Senyawa MeSA kemudian melakukan perjalanan ke jauh ke dalam daun sistemik, MeSA dikonversi menjadi SA oleh aktivitas enzim SABP2/MES (Tripathi dkk., 2019).

Pemberian SA dilaporkan dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder pada teknik kultur jaringan tumbuhan. Hal ini telah dilaporkan oleh penelitian terdahulu pada kultur akar rambur tanaman *Silybum marianum* dengan penambahan SA sebanyak 6 mg/50mL pada media cair dapat meningkatkan kandungan silymarin 2,42 kali lipat dan asam linoleat meningkat 2,37 kali lipat lebih tinggi dari kontrol (Khalili dkk., 2009). Menurut Chodisetti dkk. (2015) kultur suspensi sel *Gymnema sylvestre* dengan penambahan asam salisilat 200 μ M selama 48 jam dapat menghasilkan asam gimnemin sebanyak 43,27 \pm 0,80 mg/g DW atau meningkat 4,3 kali lipat dari kontrol.

Asam jasmonat dan metil esternya (metil jasmonat, MJ) diduga berperan sebagai transduser karena dapat mempengaruhi rantai transduksi sinyal antara kompleks reseptor-elisitor dan proses aktivasi gen sinyal pertahanan. Perlakuan MJ yang diberikan secara eksogen telah menginduksi peningkatan sementara pada jasmonat endogen (Creelman dkk., 1992), dan menginduksi aktivasi transkripsi gen yang terlibat dalam pembentukan metabolit sekunder (Ohta dkk., 2006). Pada gambar 6 menunjukkan model yang menggambarkan mekanisme respon pertahanan terhadap MJ, perlakuan luka dan kombinasi luka + MJ pada tanaman ginseng. Perlakuan MJ eksogen dapat bertindak sebagai sinyal jarak jauh dan menginduksi JA endogen yang secara enzimatik dapat meningkatkan konsentrasi senyawa volatil dalam jaringan sistemik, menghasilkan

resistensi di bagian-bagian distal tanaman tetapi juga kerusakan parah pada lokasi lokal. Pemberian MJ eksogen dapat meniru JA endogen dan menghasilkan resistensi lokal, sehingga mencegah nekrosis yang disebabkan oleh luka dengan meningkatkan konsentrasi senyawa yang mudah menguap (*volatile oil*) (Balusamy dkk., 2015).



Gambar 6 Model ilustrasi Mekanisme pertahanan tumbuhan dengan perlakuan pelukaan mekanik dan penambahan MJ eksogen (Balusamy dkk., 2015)

Metil jasmonat dilaporkan dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder pada kultur jaringan sel. Penelitian oleh (Wang dkk., 2015) menyatakan Produksi flavonoid pada kultur suspensi sel *Hypericum perforatum* pada medium cair dengan penambahan MJ 100 μ M selama 15 hari dapat meningkat sebanyak (280 mg/L) dan 2,7 kali dibandingkan dengan kultur kontrol. Pada tanaman *Rhazya stricta* dengan penambahan MJ 50 μ M selama lima hari inkubasi dapat meningkatkan kandungan terpena, konsentrasi Eburenine 3 kali lipat lebih tinggi dari kontrol. Quebrachamine tertinggi 2,5 kali lipat dari kontrol, Pleiocarpamin 1,7 kali lipat dibandingkan dengan kontrol sedangkan kandungan Tetrahydroalstonine telah meningkat 1,2 kali lipat dibandingkan dengan kontrol (Akhgari dkk., 2019).

2.5 Teknik Analisis Metabolit Sekunder

Gas Chromatography (GC) atau Kromatografi gas memiliki bidang aplikasi yang sangat luas. Fungsi utamanya adalah dalam pemisahan dan analisis campuran multi-komponen seperti minyak atsiri, hidrokarbon, dan pelarut. Secara intrinsik, dengan penggunaan *flame ionization detector* dan detektor penangkap elektron (*electron capture detector*) yang memiliki kepekaan sangat tinggi, kromatografi gas dapat secara kuantitatif menentukan material yang ada pada konsentrasi yang sangat rendah. Karena kesederhanaan, kepekaan, dan keefektifannya dalam memisahkan komponen campuran, kromatografi gas adalah salah satu alat terpenting dalam studi senyawa metabolit sekunder dan senyawa kimia lainnya yang mudah menguap. Alat ini banyak digunakan untuk analisis kuantitatif dan kualitatif campuran, untuk pemurnian senyawa, dan penentuan konstanta termokimia seperti kalor larutan dan penguapan, tekanan uap, dan koefisien aktivitas (Fauzi dkk., 2017).

Analisis Metabolit sekunder berupa senyawa volatil menggunakan GC-MS sudah sangat sering dilakukan. Kromatografi adalah istilah yang digunakan untuk menggambarkan teknik pemisahan di mana fase gerak yang membawa campuran disebabkan untuk bergerak dalam kontak dengan fase diam penyerap selektif. Kromatografi gas memiliki bidang aplikasi yang sangat luas. Namun, area penggunaannya yang pertama dan utama adalah dalam pemisahan dan analisis komponen campuran seperti minyak atsiri, hidrokarbon, dan pelarut. Penggunaan detektor *flame-ionisation* dan detektor penangkapan elektron keduanya memiliki sensitivitas sangat tinggi sebagai penangkap ion-ion yang terbawa dalam kolom. Kromatografi gas dapat secara kuantitatif menentukan bahan yang ada pada konsentrasi yang sangat rendah (Hadi dan Hameed, 2017).

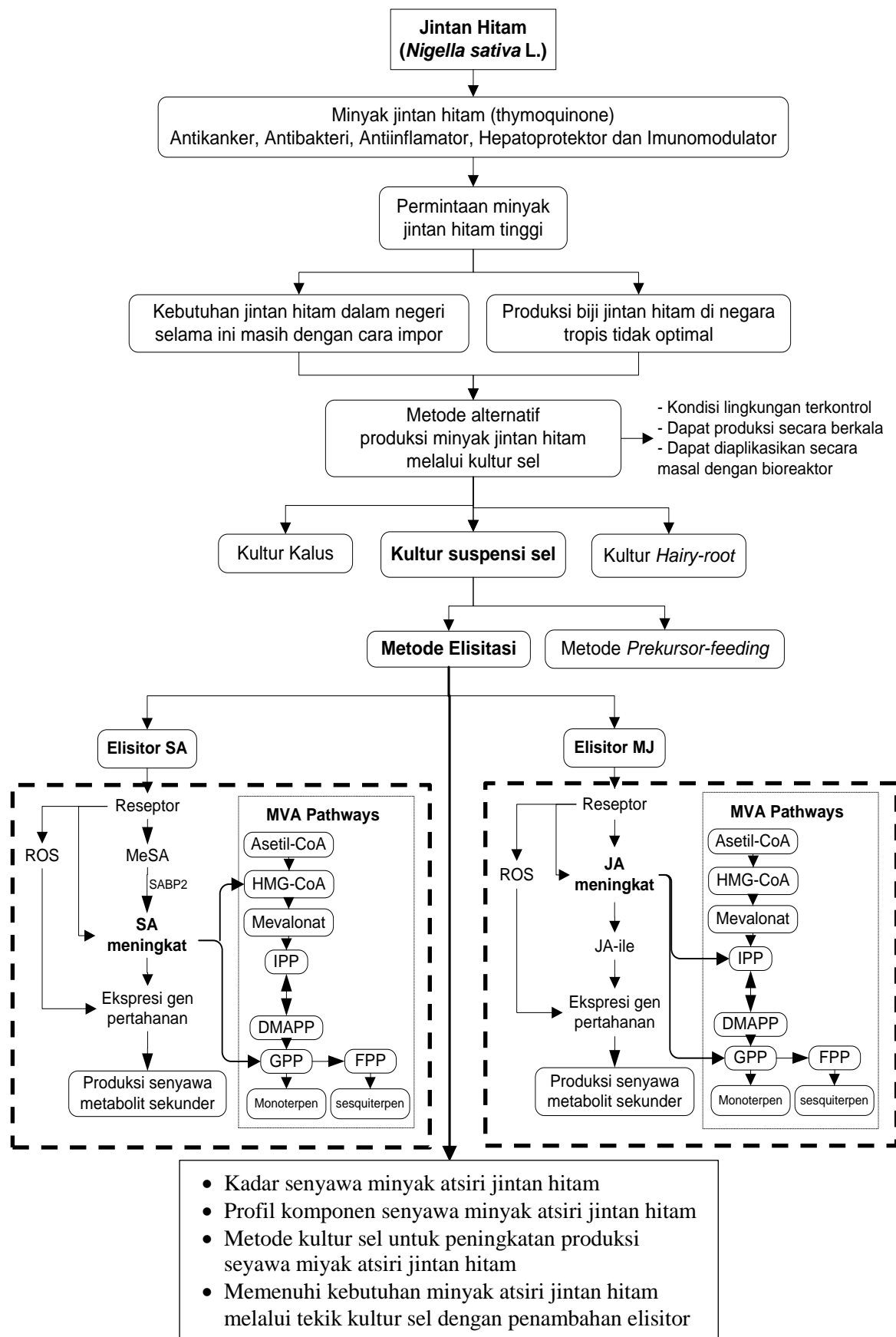
Analisis dan karakterisasi komponen minyak atsiri merupakan masalah yang cukup rumit, ditambah dengan sifatnya yang mudah menguap pada suhu kamar sehingga perlu diseleksi metode yang akan diterapkan untuk menganalisis minyak atsiri. Sejak ditemukannya kromatografi gas (GC), kendala dalam analisis komponen minyak atsiri ini mulai dapat diatasi walaupun terbatas hanya pada analisis kualitatif dan penentuan kuantitatif komponen penyusun minyak atsiri saja (Agusta, 2000).

2.6 Kerangka Konsep

Biji jintan hitam banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional karena biji jintan hitam ini memiliki kandungan utama minyak atsiri monoterpen; *p-cymene*, *γ-terpinene*, *α-pinene*, *β-pinene*, *α-thujene*, *carvacrol*, *thymol*, *thymohidroquinone* dan *thymoquinone*. Senyawa

Thymoquinone adalah senyawa bioaktif dari golongan terpenoid (monoterpen) yang merupakan salah satu senyawa yang terdapat pada minyak esensial biji jintan hitam sekitar 7,8-13,7%. Negara Indonesia memenuhi kebutuhan biji jintan hitam dalam negeri selama ini masih dengan cara impor dari India dan Mesir serta negara Timur Tengah lainnya. Berdasarkan banyaknya manfaat yang terkandung dalam biji tanaman jintan hitam. Teknik kultur sel dapat digunakan sebagai teknik produksi senyawa metabolit sekunder. Kelebihan penggunaan teknik kultur sel adalah metabolit sekunder yang dihasilkan lebih terkontrol dan tidak bergantung pada musim tanam. Teknik kultur suspensi sel menjadi suatu alternatif untuk memproduksi metabolit sekunder jintan hitam. Teknik kultur sel dengan strategi elisitasi menggunakan elisitor asam salisilat (SA) dan metil jasmonat (MJ) dilakukan untuk meningkatkan produksi senyawa minyak jintan hitam..

Elisitor SA dapat memberi sinyal jarak jauh mengubah Metil Salisilat (MeSA) endogen menjadi SA endogen dengan bantuan enzim SABP2/MES. Pemberian SA dapat meningkatkan kadar SA endogen melalui peningkatan enzim Isochorismate synthase (ICS) yang dikode gen ICS1 oleh perlakuan SA eksogen. Asam salisilat endogen secara enzimatik dapat meningkatkan produksi senyawa terpen dengan meningkatkan enzim 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMGS) dan farnesyl diphosphate synthase (FPPS) pada jalur MVA. Asam salisilat endogen yang meningkat juga mengkode gen pertahanan untuk meningkatkan respon pertahanan, salah satu senyawa pertahanan adalah monoterpen dan sesquiterpen volatil. Pemberian MJ diterima reseptor, reseptor menginduksi peningkatan FA pada biosintesis JA dengan bantuan enzim LOX, AOS dan AOC. Produksi JA yang meningkat melalui jalur octadecanoid, selanjutnya meningkatkan transkripsi gen pengkode respon pertahanan. Asam jasmonat yang meningkat juga dapat berperan langsung pada jalur MVA melalui peningkatan enzim 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) dan Isopentenil diphosphate isomerase (IDI) dalam memproduksi minyak atsiri (senyawa volatil) sebagai salah satu bentuk pertahanan pada tanaman jintan hitam (Gambar 7). Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan produksi senyawa *thymoquinone* dan senyawa monoterpen maupun sesquiterpen lain sehingga dapat meningkatkan produksi minyak jintan hitam dan dapat memenuhi kebutuhan minyak jintan hitam dalam negeri.



Gambar 7. Kerangka Konsep

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

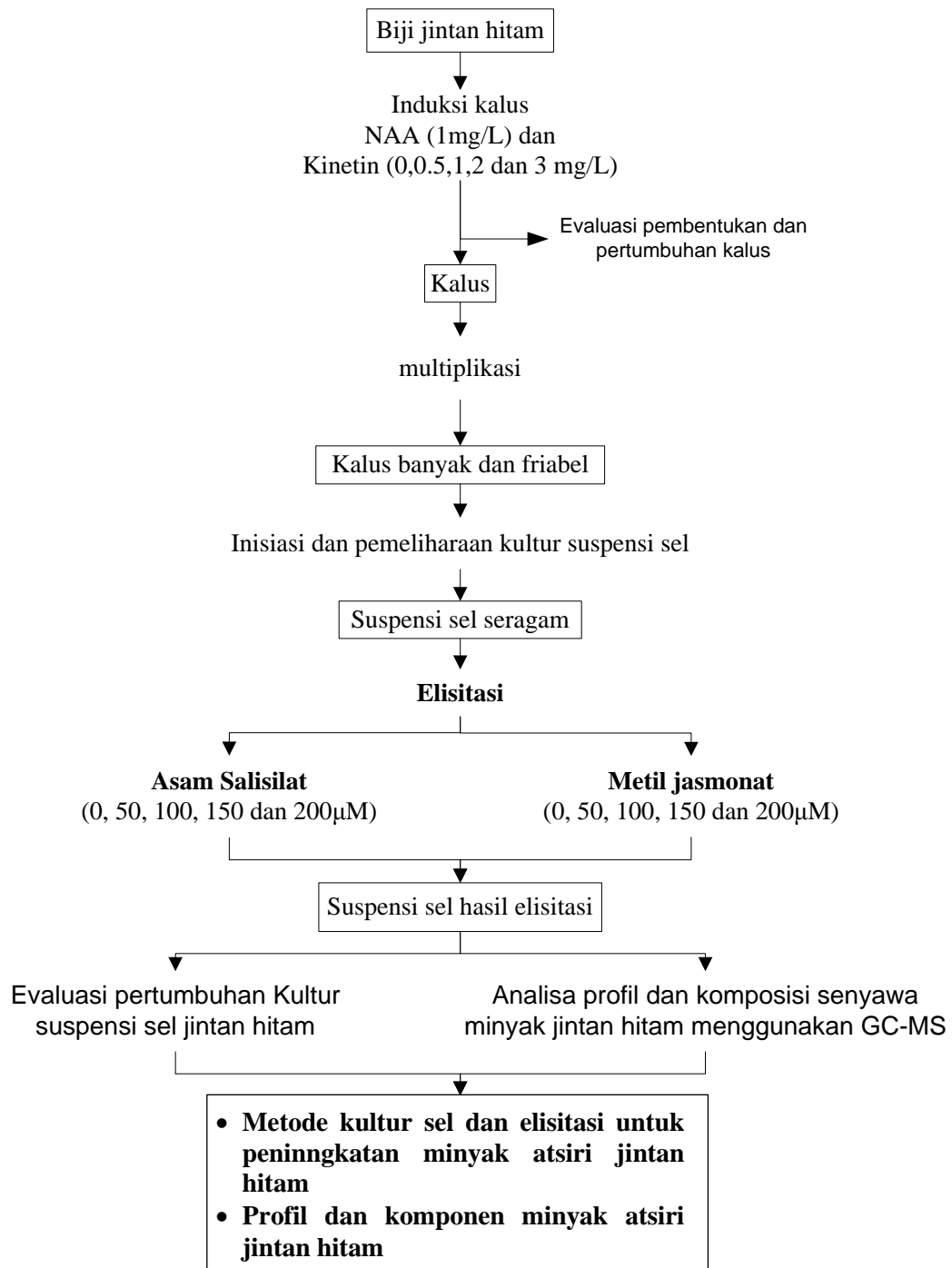
Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2020 – April 2021 di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang. Pengujian kandungan metabolit sekunder pada penelitian ini menggunakan alat GC-MS dan dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang.

3.2 Kerangka Oprasional

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap yaitu; induksi kalus, induksi kultur suspensi sel dan perlakuan elisitasi (Gambar 8). Eksplan jintan hitam yang digunakan untuk induksi kalus berupa biji. Biji jintan hitam disterilasi dan dikultur dengan menggunakan media induksi kalus dengan media dasar MS NAA 1 mg/L + beberapa konsentrasi kinetin (0; 0,5; 1; 2 dan 3 mg/L). Kalus dari perlakuan terbaik dimultiplikasi dengan subkultur dua kali menggunakan media yang sama, dan diinkubasi selama tiga minggu di bawah kondisi gelap.

Kalus hasil multiplikasi disubkultur dalam media cair dengan konsentrasi ZPT yang sama dengan media kalus, kultur suspensi sel diinkubasi selama 10 hari di bawah kondisi gelap dan dimultiplikasi hingga subkultur kedua. Kultur suspensi sel disubkultur ke dalam media elisitasi dengan waktu inkubasi selama 10 hari pada *Rotary-shaker* dengan kecepatan 110 rpm pada suhu 25°C di bawah kondisi gelap. Perlakuan elisitasi menggunakan 2 macam elisitor berupa asam salisilat dan metil jasmonat dengan konsentrasi: 0, 50, 100, 150 dan 200 µM.

Setelah perlakuan elisitasi, diamati pertumbuhan kultur suspensi sel (SCV, PCV, berat basah, berat kering, IP, viabilitas sel) dan kandungan serta profil senyawa metabolit sekunder. Uji kandungan senyawa minyak jintan hitam menggunakan metode GC-MS. Data kualitatif dianalisis secara deskriptif dan data kuantitatif dianalisis dengan ANOVA menggunakan aplikasi IBM SPSS Statistic 20.0. Uji selanjutnya pada kelompok perlakuan Asam salisilat dan Metil jasmonat diuji dengan *Independend-sample T-test*.



Gambar 8. Kerangka Operasional

3.3 Prosedur Penelitian

Tahapan kegiatan penelitian meliputi: pembuatan media, induksi dan multiplikasi kalus, inisiasi dan pemeliharaan kultur suspensi sel, elisitasi kultur suspensi sel dengan elisitor asam salisilat dan metil jasmonat, evaluasi pertumbuhan kultur suspensi sel hasil elisitasi dan analisis profil serta komponen minyak atsiri jintan hitam dengan GC-MS.

3.3.1 Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media perlakuan induksi kalus, media multiplikasi kalus, media inisiasi dan pemeliharaan kultur suspensi sel dan media perlakuan elisitasi. Media induksi kalus menggunakan media dasar MS dengan penambahan kombinasi NAA 1 mg/L dan Kinetin (0; 0,5; 1; 2 dan 3 mg/L). Media multiplikasi kalus dan inisiasi kultur suspensi sel menggunakan media terbaik dari perlakuan induksi kalus. Media perlakuan elisitasi adalah media dasar MS cair dengan penambahan NAA 1 mg/L + Kinetin 2 mg/L + elisitor SA dan MJ masing-masing dengan konsentrasi (0, 50, 100, 150 dan 200 μ M).

Tahapan untuk membuat media MS 1 liter adalah dengan diambil larutan stok MS: stok A, B, C, D, E, F, G, vitamin MS dan myo-inisitol (komposisi sesuai Lampiran 1) dicampurkan ke dalam erlenmeyer berukuran 1 liter dan ditambahkan ZPT dengan konsentrasi yang ditentukan. Erlenmeyer berisi media MS dan ZPT ditambahkan sukrosa 30 g/L dan hormon yang telah ditentukan, kemudian ditambahkan aquades hingga volume larutan mencapai 1 liter. Larutan media diaduk dengan menggunakan *magnetic stirer* hingga larutan homogen. Larutan media yang telah homogen diatur pH larutan hingga mencapai pH 5,79-5,81. Larutan media ditambahkan agar 8,5 gram (untuk media inisiasi pemeliharaan kultur suspensi sel dan media perlakuan elisitasi tidak diberi agar), kemudian larutan media dipanaskan di atas *hotplate stirer* hingga mendidih. Media diangkat dan dituangkan ke dalam botol kultur. Botol kultur yang telah berisi media ditutup dengan plastik dan diberi label. Botol yang telah tertutup disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1atm selama 15 menit. Penambahan elisitor SA dan MJ pada media perlakuan elisitasi dilakukan di dalam *laminar air flow* setelah sterilisasi autoklaf selesai, masing-masing penambahan elisitor sesuai konsentrasi yang ditentukan (pengambilan elisitor sesuai Lampiran 2).

3.3.2 Induksi dan Multiplikasi Kalus Jintan Hitam

Biji jintan hitam diletakkan ke dalam gelas beker dan dialiri air selama 2-3 jam, kemudian biji dipindahkan ke dalam gelas erlenmeyer dan dipindah ke dalam LAF. Biji

jintan hitam direndam menggunakan alkohol 70% selama satu menit, setelah direndam alkohol biji dimasukkan ke dalam larutan NaOCl 0,3% dan digoyangkan selama lima menit. Biji dibilas aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing selama lima menit (Aleml dkk., 2013).

Eksplan biji steril diletakkan di atas cawan petri dan dipotong bagian pangkal. Biji yang sudah terpotong bagian pangkalnya dikultur pada media induksi kalus menggunakan media dasar MS yang ditambah dengan NAA 1 mg/L dan kinetin (0; 0,5; 1; 2 dan 3 mg/L). Setiap perlakuan dilakukan sebanyak 10 kali ulangan, setiap botol dikultur lima eksplan biji. Kultur biji diinkubasi selama lima minggu di bawah kondisi gelap dengan suhu 25°C selama lima minggu. Parameter pengamatan pada induksi kalus meliputi waktu muncul kalus, persentase eksplan hidup, persentase eksplan tumbuh kalus, berat basah kalus dan morfologi kalus. Kalus dengan pertumbuhan terbaik disubkultur pada media induksi kalus baru. Kalus diinkubasi selama tiga minggu di bawah kondisi gelap. Subkultur kalus jintan hitam dilakukan hingga subkultur kedua dan diperoleh kalus yang banyak dan seragam.

3.3.3 Inisiasi dan Pemeliharaan Kultur Suspensi Sel

Inisiasi kultur suspensi sel dilakukan untuk memperoleh suspensi sel dari kalus hasil multipikasi. Kalus dicacah agar mendapatkan sel-sel kalus dan agregat sel terpisah. Kalus remah ditimbang 1 gram dan dikultur ke dalam media cair 25 mL dengan penambahan ZPT yang sama dengan media induksi kalus terbaik (NAA 1 mg/L + Kinetin 2 mg/L). Kultur suspensi sel diinkubasi selama dua minggu pada *incubator-rotaryshaker* dengan kecepatan 110 rpm pada suhu 25°C di bawah kondisi gelap. Penentuan kurva pertumbuhan kultur suspensi sel jintan hitam dilakukan dengan mengukur persentase volume endapan sel diukur setiap hari selama 14 hari setelah kultur, pengukuran kurva mengikuti metode dari penelitian Mustafa dkk. (2011). Kultur suspensi sel yang telah terbentuk selanjutnya disubkultur setiap 10 hari sekali sesuai dengan kurva pertumbuhan yang diperoleh, subkultur suspensi sel dilakukan hingga subkultur kedua pada media cair yang sama.

3.3.4 Elisitasi Kultur Suspensi Sel dengan Asam Salisilat dan Metil Jasmonat

Elisitasi dilakukan dengan cara kultur suspensi sel dari subkultur kedua ditimbang 1 gram dan disubkultur ke dalam setiap botol media cair yang berisi 25 mL media perlakuan elisitor SA dan MJ. Kultur suspensi sel hasil elisitasi diamati setelah 10 hari perlakuan sesuai kurva pertumbuhan. Kultur suspensi sel perlakuan elisitor diinkubasi dalam *incubator-rotaryshaker* dengan kecepatan 110 rpm pada suhu 25°C di bawah kondisi gelap. Evaluasi pertumbuhan hasil perlakuan elisitasi dilakukan setelah perlakuan elisitasi

pada kultur suspensi sel. Pengamatan yang dilakukan terdiri dari SCV (*Settled Cell Volume*), PCV (*Packed Cell Volume*), berat basah, berat kering, IP (Indeks Pertumbuhan) dan viabilitas sel. Pengujian kandungan metabolit sekunder (minyak atsiri jintan hitam) dengan menggunakan GC-MS.

3.3.5 Evaluasi Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Hasil Perlakuan Elisitasi

Persentase SCV ditentukan dengan cara mengendapkan kultur suspensi sel dalam gelas ukur. Kultur suspensi sel dituang kedalam gelas ukur dengan volume 25 mL. Kultur suspensi sel didiamkan selama 30 menit, lalu dicatat volume endapan sel yang terbentuk. Sel didiamkan kembali selama 30 menit dan diambil pembacaan kedua. Jika variasi antara pembacaan kedua lebih tinggi 5% dari pembacaan pertama, sel didiamkan kembali dan dilakukan pengukuran ketiga setelah 30 menit dan diambil rata-rata dari semua pembacaan yang diperoleh. Nilai PCV ditentukan dengan menuangkan 10 mL kultur suspensi sel ke dalam tabung sentrifugasi 15 mL. Tabung berisi sampel disentrifugasi pada kecepatan 200 ×g selama lima menit. Endapan sel yang terbentuk dihitung volume sel (*pellet*) dengan media cair (*supernatant*) (Godoy-Hernández dan Vázquez-Flota, 2012).

Pengamatan berat basah dan berat kering sel merujuk metode penelitian terdahulu Permanasari (2015). Kultur suspensi sel disaring dengan menggunakan kertas saring whatman no.42 diameter 125 mm hingga media cair tersaring sepenuhnya selama ±lima jam. Sel yang telah disaring ditimbang menggunakan neraca analitik sebagai data berat basah sel, selanjutnya sel dikeringkan menggunakan oven suhu 60°C selama 12 jam. Setelah kering, sel kering ditimbang dengan neraca analitik sebagai data berat kering.

Nilai IP kultur suspensi sel yang telah diberi perlakuan elisitasi selama 10 hari dihitung menggunakan rumus merujuk pada Godoy-Hernández dan Vázquez-Flota (2012), dimana IP adalah indeks pertumbuhan, X_f adalah berat akhir dan X_o adalah berat awal sel. Rumus perhitungan nilai IP sebagai berikut:

$$IP = \frac{X_f - X_o}{X_o}$$

Pengamatan viabilitas kultur suspensi sel dilakukan setelah 10 hari kultur elisitasi. Metode pengamatan viabilitas ini dilakukan dengan merujuk pada penelitian Khanpour-Ardestani dkk. (2015). Kultur suspensi sel hasil perlakuan elisitasi diambil 100 µL dan diberi pewarna Evans Blue 0.25% dengan perbandingan (1:1) suspensi sel : evans blue. Larutan sampel dan pewarna diinkubasi selama lima menit. Sampel diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya. Sel yang terwarnai hingga berwarna biru pekat maka sel

tersebut merupakan sel mati dan apabila diperoleh sel berwarna biru transparan maka sel hidup. Rumus perhitungan viabilitas sel merujuk pada penelitian Sari (2018) sebagai berikut:

$$\text{Persentase viabilitas sel (\%)} = \frac{\text{jumlah sel viabel}}{\text{jumlah sel dalam satu bidang pandang}} \times 100\%$$

3.3.6 Analisis Profil dan Komponen Minyak Atsiri Jitan Hitam dengan GC-MS

Sampel biji dan kultur suspensi sel dihaluskan dengan mortar dan alu. Sampel 0,1 gram dimaserasi dalam erlenmeyer dengan pelarut 25 mL n-heksana. Sampel diaduk hingga homogen dan didiamkan selama 24 jam pada suhu dingin dalam keadaan tertutup. Larutan sampel disaring dengan perangkat *vaccum-filter* dengan kertas saring whatman no.42, sehingga diperoleh filtrat dan ampas. Ampas dari hasil penyaringan dilakukan proses maserasi dan penyaringan ulang sebanyak tiga kali, sehingga diperoleh total larutan filtrat sebanyak 100 mL. Larutan filtrat hasil penggabungan sebanyak 100 mL didestilasi dengan alat *rotary evaporator* dan diperoleh rendemen ekstrak. Rendemen ekstrak hasil evaporator dilarutkan kembali dengan pelarut n-heksana sebanyak 25 mL dan dihomogenasi dengan vortex. Larutan hasil homogenasi disaring menggunakan *vaccum-filter* dengan membran filter PTFE diameter 47 mm pori 0,45 µm. Larutan hasil filtrasi diambil sebanyak 0,1 mL dan dimasukkan ke dalam mikrotube. Sampel dilakukan proses penguapan (*degassing*) dan selanjutnya residu hasil penguapan dianalisis dengan alat GC-MS.

Analisis senyawa minyak atsiri jitan hitam dilakukan dengan mengambil cairan hasil akhir ekstraksi minyak dari sampel biji dan kultur suspensi sel. Analisis GC-MS dilakukan dengan menggunakan *Gas Chromatograph Mass Spectrometer* SHIMADZU GCMS-QP2010 SE. Sampel hasil ekstraksi diinjeksi sebanyak 1 µL pada kolom ZB – AAA (10 mL x 0,25 mmLD Phenomenex Inc) dengan suhu *Vaporization chamber* 280°C, suhu *Column oven* 110°C - 320°C, suhu injeksi 200°C, tekanan konstan 15 kPa, rasio split 127,5 dengan helium sebagai gas pembawa, suhu interface 280°C dan suhu ionisasi 200°C selama 60 menit. Kuantifikasi semua komponen yang teridentifikasi dan dihitung menggunakan persen daerah puncak relatif. Identifikasi sementara dari senyawa dilakukan berdasarkan perbandingan waktu retensi relatif dan spektrum massa dari data Library NIST, WILEY GC-MS system.

3.4 Rancangan Percobaan

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK). Pada tahap induksi kalus jintan hitam variabel bebas satu faktor yang ditetapkan adalah perlakuan variasi antara NAA 1 mg/L dan kinetin (0; 0,5; 1; 2 dan 3 mg/L). pada tahap elisitasi variabel bebas dua faktor yang ditetapkan yaitu pemberian jenis elisitor (SA dan MJ) dan konsentrasi elisitor (0, 50, 100, 150 dan 200 μ M). Setiap perlakuan pada induksi kalus dan elisitasi terdapat 10 ulangan.

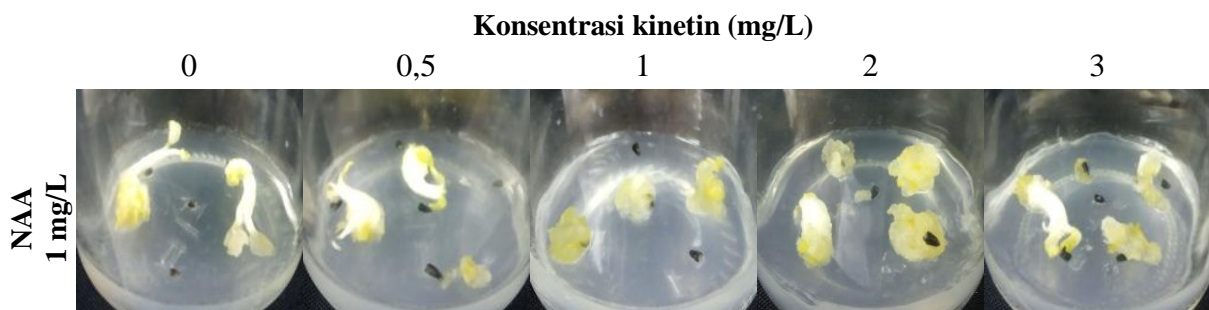
3.5 Analisa Data

Data yang diperoleh dari perlakuan induksi kalus meliputi waktu muncul kalus, persentase eksplan hidup, persentase eksplan tumbuh kalus dan berat basah kalus dianalisis dengan ANOVA satu arah. Data perlakuan jenis elisitor (SA dan MJ) dan konsentrasi elisitor meliputi SCV, PCV, berat basah, berat kering, IP dan viabilitas sel dianalisis dengan menggunakan ANOVA dua arah. Apabila terdapat perbedaan nyata pada perlakuan maka dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* ($\alpha = 0,05$). Setiap konsentrasi elisitor dilakukan uji *Independent sample T-test* dengan persentase kepercayaan 95%.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

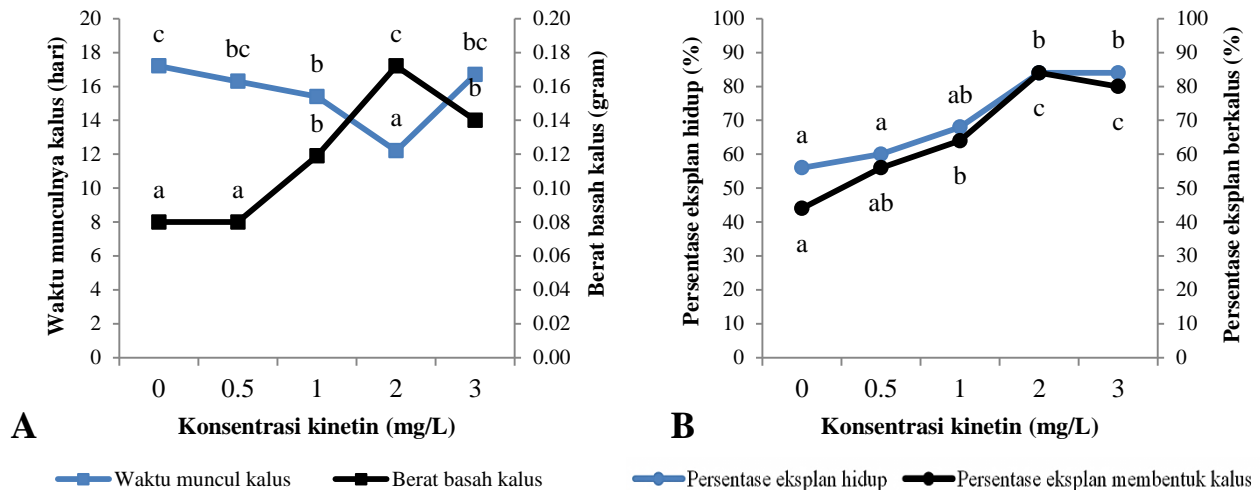
4.1 Pengaruh Konsentrasi Kinetin terhadap Induksi Kalus Biji Jintan Hitam

Kalus jintan hitam dapat diinisiasi dari eksplan biji yang dikultur pada media MS + NAA 1 mg/L dan kinetin (0; 0,5; 1; 2 dan 3 mg/L). konsentrasi kinetin pada media induksi kalus biji jintan hitam berpengaruh terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus dari eksplan biji. Semakin tinggi konsentrasi kinetin maka pertumbuhan kalus semakin meningkat (Gambar 9). Secara umum konsentrasi kinetin tidak berpengaruh terhadap tekstur dan warna kalus. Kalus yang dihasilkan pada semua perlakuan bertekstur remah dan berwarna putih-kekuningan.



Gambar 9. Respon pertumbuhan kalus dari eksplan biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) pada media MS dengan penambahan NAA 1 mg/L dan berbagai konsentrasi kinetin setelah lima minggu kultur.

Media dengan penambahan 1 mg/L NAA tanpa kinetin hanya dapat menginduksi kalus dari eksplan biji dengan ukuran yang lebih kecil dan pertumbuhan lebih lambat jika dibandingkan dengan NAA + kinetin. Pada media tanpa pemberian kinetin menunjukkan pertumbuhan kalus diikuti dengan pertumbuhan kecambah pada eksplan biji. Pada pemberian kinetin 1 mg/L eksplan biji tidak menunjukkan pertumbuhan kecambah, namun pada pemberian kinetin konsentrasi 2 mg/L dan 3 mg/L menunjukkan sedikit pertumbuhan kecambah pada eksplan biji dan diikuti pertumbuhan kalus yang lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi kinetin yang lebih rendah.



Gambar 10. Pengaruh beberapa konsentrasi kinetin yang dikombinasikan dengan NAA 1 mg/L terhadap induksi kalus biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.)

Keterangan: (A) waktu muncul kalus dan berat basah kalus, (B) Persentase eksplan hidup dan persentase eksplan membentuk kalus. Notasi yang sama pada masing-masing parameter menunjukkan tidak ada pengaruh signifikan antara konsentrasi yang berbeda (DMRT $P < 0.05$)

Kombinasi berbagai konsentrasi kinetin dengan NAA 1 mg/L secara signifikan mempengaruhi berat basah kalus jintan hitam (Lampiran 3: LT 3.5). Kinetin dengan konsentrasi semakin tinggi maka semakin tinggi pula berat basah kalus yang dihasilkan. Pada media kontrol dan media penambahan kinetin 0,5 mg/L menunjukkan tidak ada beda nyata terhadap berat basah kalus (0,09 gram). Berat basah kalus mulai meningkat pada konsentrasi kinetin 1 mg/L, sedangkan pada konsentrasi kinetin 2 mg/L berat basah kalus meningkat hingga 0,17 gram dan menurun pada konsentrasi kinetin 3 mg/L.

Konsentrasi kinetin juga berpengaruh terhadap persentase eksplan hidup dan persentase eksplan yang membentuk kalus (Lampiran 3: LT 3.3 dan L.T 3.4). Konsentrasi kinetin yang semakin tinggi maka persentase eksplan hidup dan persentase eksplan biji yang membentuk kalus semakin meningkat. Persentase eksplan hidup dan persentase eksplan yang membentuk kalus pada media tanpa penambahan kinetin dan media yang ditambahkan kinetin 0.5 mg/L menghasilkan rata-rata dibawah 60%. Pada penambahan kinetin 1 mg/L mulai menunjukkan peningkatan persentase eksplan hidup dan persentase eksplan berkalus. Penambahan kinetin 2 mg/L dan 3 mg/L dapat secara optimal menginduksi pertumbuhan kalus dengan persentase eksplan hidup dan membentuk kalus sebesar 84 %.

Konsentrasi kinetin tidak berpengaruh pada warna dan tekstur kalus jintan hitam, kalus yang dihasilkan pada seluruh perlakuan berwarna kuning dan bertekstur remah.

Warna kalus yang kuning dapat dipengaruhi oleh jenis eksplan yang digunakan dan kondisi ruang pada induksi kalus yang menggunakan ruang inkubasi gelap. Penelitian terdahulu pada kultur kalus *Sorgum bicolor* diinkubasi dalam kondisi gelap dengan media MS dengan penambahan 2,4-D 3 mg/L + NAA 2.5 mg/L menghasilkan kalus berwarna putih kekuningan dengan tekstur kalus yang remah (Ramulifho dkk., 2019). Kalus dari eksplan biji dapat menghasilkan warna kuning dan tekstur kalus yang remah juga telah dilaporkan oleh penelitian Osman dkk. (2016) bahwa induksi kalus dengan eksplan endosperma biji *Barringtonia racemosa* diperoleh kalus berwarna kuning dan remah pada kondisi gelap pada media MS yang dilengkapi dengan 1,0 mg/L 2,4-D dan 1,5 mg/L kinetin. Keseimbangan antara konsentrasi auksin dan sitokinin yang tepat dapat mempercepat waktu inisiasi kalus. Hormon auksin umumnya tidak mudah terdegradasi di dalam ruangan gelap, sehingga mempercepat waktu inisiasi kalus pada eksplan. Pelukaan pada eksplan biasa dilakukan untuk memicu terbentuknya kalus. Induksi kalus juga dipengaruhi oleh pemberian sitokinin, seperti BA (Kurniati dkk., 2016).

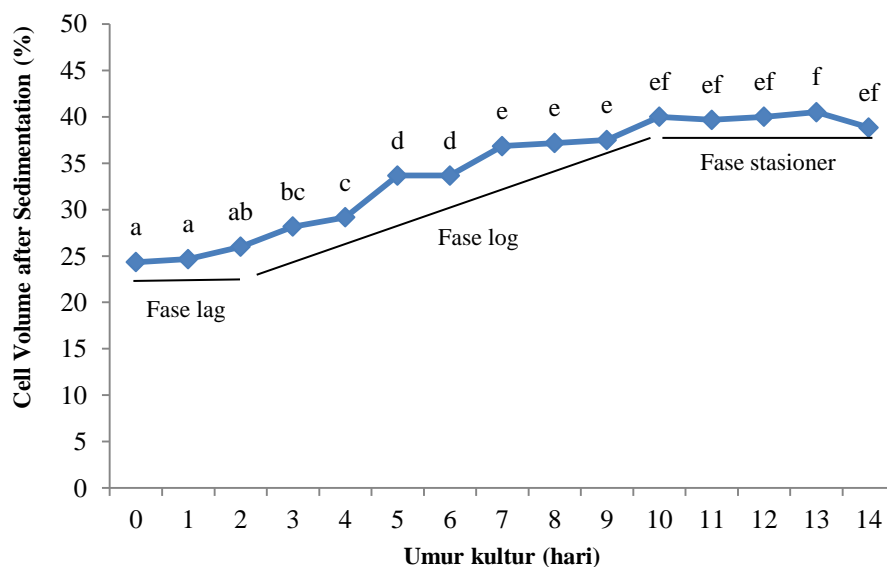
Perlakuan 1 mg/L NAA dengan atau tanpa kombinasi kinetin pada media induksi kalus dapat menginduksi pertumbuhan kalus pada eksplan biji jantan hitam, pada media NAA 1 mg/L tanpa kinetin dapat menyebabkan pertumbuhan kecambah yang menggembung dan diikuti dengan pertumbuhan kalus, semakin tinggi konsentrasi kinetin maka semakin besar pengaruhnya terhadap induksi kalus pada eksplan. Pada penelitian terdahulu menggunakan eksplan batang dan *shoot tip* dari tanaman *Phyla nodiflora* dengan perlakuan media dasar MS yang ditambah dengan NAA tanpa dikombinasikan dengan sitokinin sudah dapat menginduksi pembentukan kalus, dengan hasil persentase eksplan berkalus tinggi (Ahmed dkk., 2011).

Sridhar dan Naidu (2011) menyatakan bahwa penambahan NAA 3 mg/L + BA 0.5 mg/L pada media induksi kalus *Solanum nigrum* L dapat menghasilkan kalus yang kompak dengan respon berkalus yang lebih tinggi. Menurut Alemi dkk. (2013) eksplan terbaik dalam induksi kalus jantan hitam dengan menggunakan kotiledon *in vitro* berumur dua minggu yang dikultur pada media induksi kecambah ½ MS tanpa penambahan ZPT, lalu disubkultur pada media induksi kalus MS dengan ZPT 2,4-D 1 mg/L dan kinetin 2,15 mg/L di bawah kondisi gelap. Kalus tumbuh dari eksplan kotiledon dengan waktu tercepat selama enam hari setelah inisiasi dan diperoleh kalus yang remah-berair (*friable-watery*). Hal ini didukung oleh pernyataan Beigmohamadi dkk. (2019) kultur kalus digunakan untuk pembentukan kultur suspensi sel untuk inisiasi pertama. Kultur suspensi sel yang baik dibutuhkan bahan atau sumber kalus yang remah.

Induksi kalus jantan hitam dengan menggunakan eksplan epikotil pada media MS dengan penambahan NAA 1 mg/L + Kinetin 2 mg/L menghasilkan kalus terbaik dengan tekstur remah dan lembut (*creamy and friable*) yang tumbuh cepat dibandingkan dengan jenis eksplan yang berbeda dari kecambah jantan hitam pada kombinasi ZPT yang berbeda. Kombinasi NAA 1 mg/L + Kinetin 2 mg/L dan IAA 1 mg/L + BAP 2 mg/L memberikan respon pembentukan kalus terbaik dengan berat basah kalus epikotil yaitu 82,6% dan 72,6%. Sitokinin atau auksin saja tidak mendukung pembentukan kalus sedangkan pada kontrol pertumbuhan berkurang dengan 17,24% kalus (Chaudhry dkk., 2014b).

4.2 Pengaruh Elisitor Asam Salisilat dan Metil Jasmonat pada Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Jantan Hitam

Fase-fase pada kurva pertumbuhan kultur suspensi sel perlu diamati sebelum dilakukan perlakuan elisitasi. Kurva pertumbuhan kultur suspensi sel ditentukan berdasarkan persentase volume endapan sel (SCV) yang diamati setiap hari selama 14 hari kultur (Lampiran 4). Kultur suspensi sel jantan hitam menunjukkan kurva pertumbuhan dengan tiga fase pertumbuhan yaitu fase lag, fase log, dan fase stasioner.

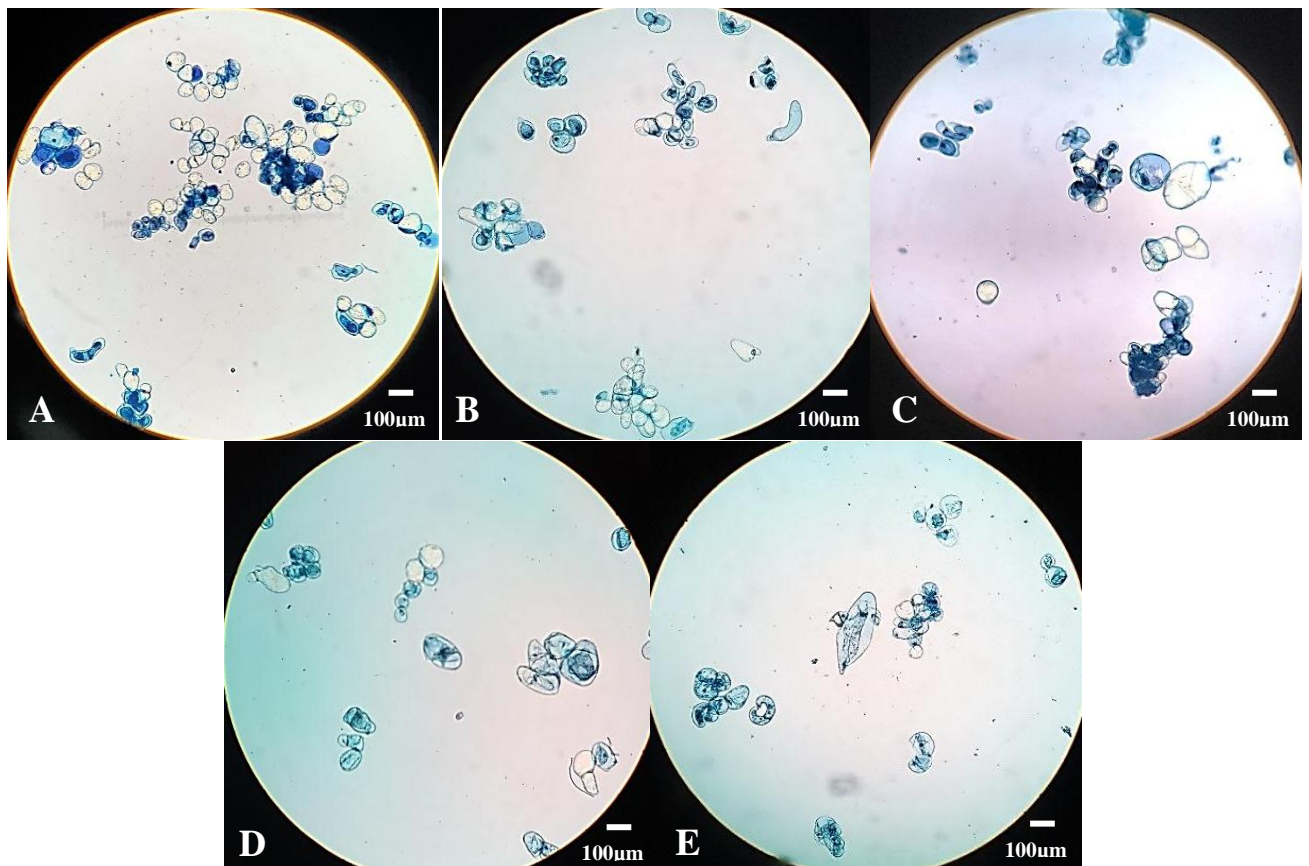


Gambar 11. Kurva pertumbuhan kultur suspensi sel jantan hitam pada media cair MS + NAA 1 mg/L + Kinetin 2 mg/L selama 14 hari kultur

Kultur suspensi sel jantan hitam pada hari pertama inisiasi hingga hari ke-2 tidak menunjukkan pertambahan SCV secara signifikan. Hal ini ditunjukkan SCV pada hari pertama inisiasi hingga hari ke-2 tidak ada beda nyata, sehingga dapat diidentifikasi bahwa kultur suspensi sel berada pada fase lag (adaptasi). Kultur suspensi sel mengalami peningkatan SCV mulai dari hari ke-3 hingga hari ke-9 kultur. Hal ini ditunjukkan SCV

pada hari ke-3 hingga hari ke-9 terdapat beda nyata, sehingga dapat diidentifikasi bahwa kultur suspensi sel berada pada fase log (pertumbuhan). Kultur suspensi sel mulai menunjukkan tidak ada perubahan yang signifikan pada hari ke-10 hingga hari ke-14, sehingga dapat diidentifikasi bahwa kultur suspensi sel berada pada fase stasioner.

Berdasarkan kurva pertumbuhan kultur suspensi sel, waktu dalam penentuan lama perlakuan elisitasi menggunakan asam salisilat dan metil jasmonat dilakukan pada fase awal stasioner yaitu pada hari ke-10 kultur. Fase awal stasioner adalah fase meningkatnya metabolit sekunder pada kultur sel, sehingga diharapkan metabolit sekunder (minyak atsiri) jintan hitam terakumulasi secara optimal pada hari ke-10. Selain akumulasi metabolit sekunder terjadi pada fase stasioner, pada fase itu juga sudah tidak ada penambahan biomassa sel sehingga pada hari ke-10 kultur diharapkan biomassa sel yang diperoleh sudah dalam kondisi yang optimal.

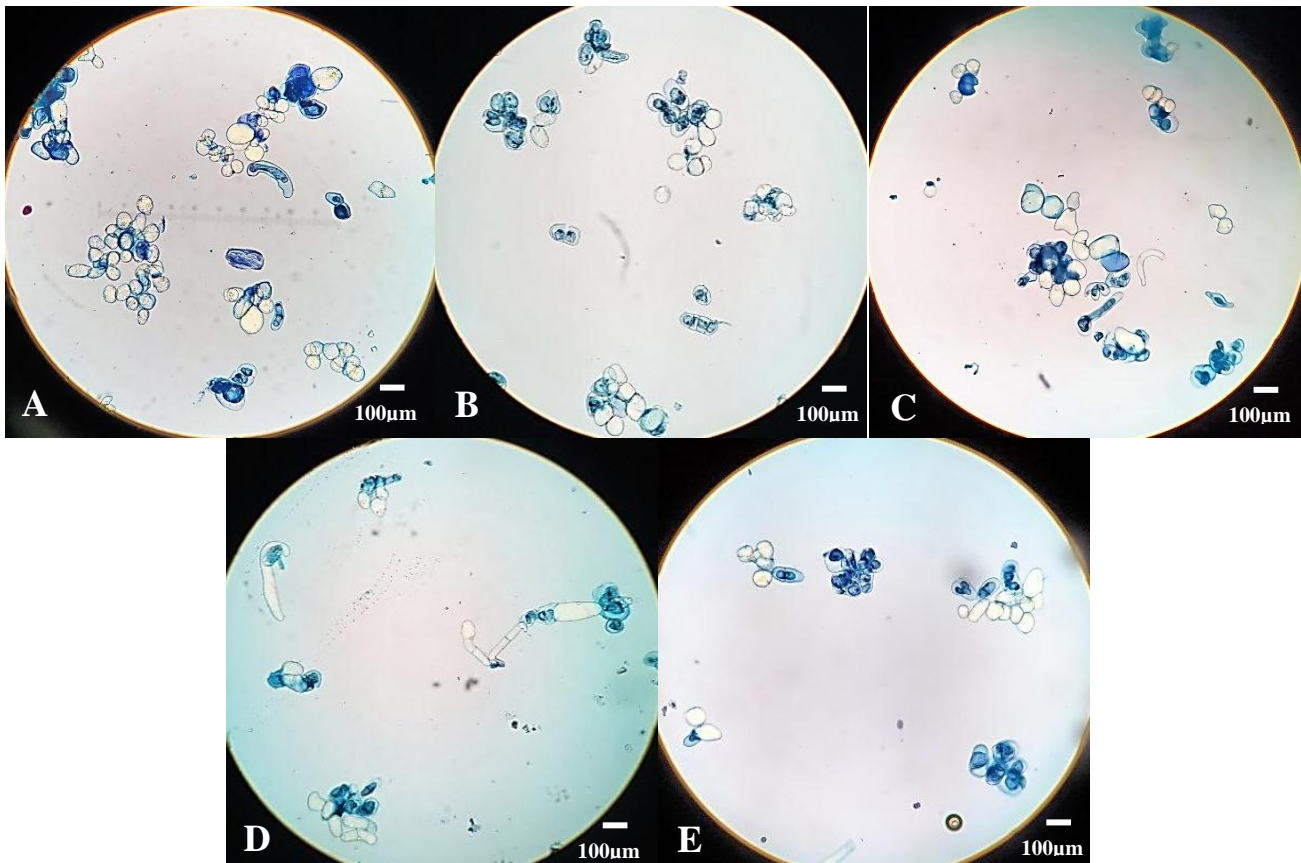


Gambar 12. Viabilitas sel pada kultur suspensi sel jintan hitam pada media cair dengan penambahan elisitor asam salisilat setelah 10 hari kultur

Keterangan: Uji viabilitas sel dengan pewarna *Evans blue* diamati menggunakan mikroskop binokuler pada perbesaran 10x10. Sel berwarna biru menandakan sel mati

(A) 0 μ M; (B) 50 μ M; (C) 100 μ M; (D) 150 μ M dan (E) 200 μ M

Sel hasil kultur suspensi sel jantan hitam yang diamati memiliki beberapa bentuk yaitu sel bulat, sel panjang dan sel koma. Secara umum pada semua perlakuan menunjukkan sel berbentuk bulat yang paling banyak, namun ketiga bentuk morfologi sel juga dapat ditemui pada semua perlakuan. Sehingga penambahan elisitor SA dan MJ tidak berpengaruh terhadap morfologi sel yang terbentuk pada kultur suspensi sel jantan hitam.



Gambar 13. Viabilitas sel kultur suspensi sel jantan hitam pada media cair dengan penambahan elisitor MJ setelah 10 hari kultur.

Keterangan: Uji viabilitas sel dengan pewarna *Evans blue* diamati menggunakan mikroskop binokuler pada perbesaran 10x10. Sel berwarna biru menandakan sel mati

(A) 0 µM; (B) 50 µM; (C) 100 µM; (D) 150 µM dan (E) 200 µM

Elisitasi menggunakan SA dan MJ pada kultur suspensi sel dapat berpengaruh terhadap pertumbuhan kultur suspensi sel jantan hitam. Secara umum, tingkat pertumbuhan kultur suspensi sel jantan hitam hasil elisitasi mengalami penurunan pertumbuhan. Perlakuan elisitor SA maupun MJ dengan konsentrasi tinggi dapat menurunkan viabilitas kultur suspensi sel jantan hitam. Semakin tinggi konsentrasi elisitor viabilitas sel pada kultur suspensi sel semakin menurun. Penambahan elisitor SA secara signifikan dapat mempengaruhi persentase viabilitas sel, pada kultur suspensi sel tanpa pemberian elisitor

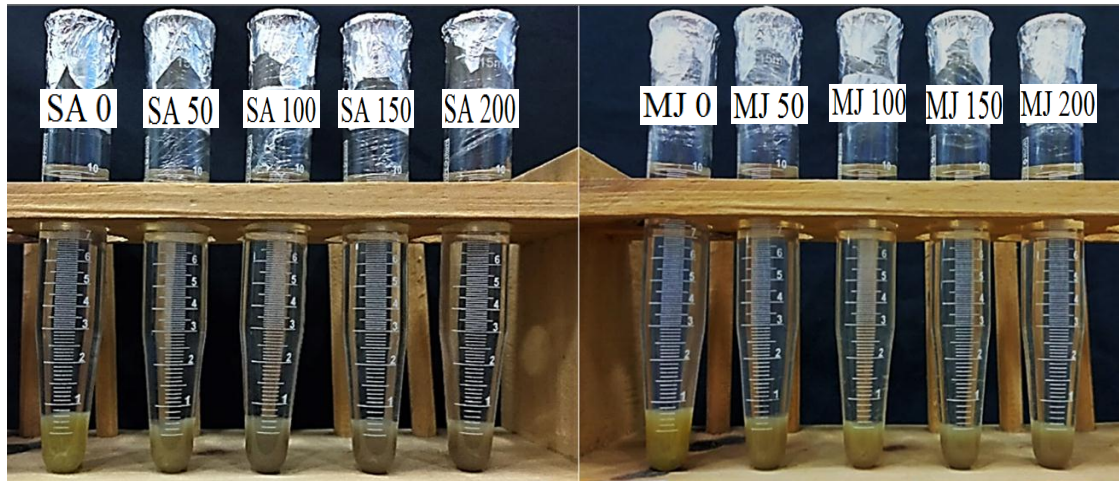
diperoleh sel-sel hidup yang lebih banyak dari sel-sel mati. Semakin tinggi konsentrasi elisitor SA semakin tinggi kematian sel pada kultur suspensi sel (Gambar 12). Hal tersebut juga ditunjukkan pada kultur suspensi sel dengan elisitor MJ, semakin tinggi konsentrasi elisitor MJ maka viabilitas sel pada kultur suspensi sel semakin menurun (Gambar 13). Elisitor SA lebih berpengaruh terhadap kematian sel pada kultur suspensi sel dibandingkan dengan elisitor MJ.

Elisitor SA maupun MJ berpengaruh terhadap volume endapan sel pada kultur suspensi sel jintan hitam. Pemberian konsentrasi elisitor SA maupun MJ yang berbeda tidak berpengaruh terhadap penurunan endapan sel pada pengamatan SCV (Gambar 14). Volume endapan sel pada kontrol lebih berwarna kuning muda dan lebih tinggi dibandingkan dengan volume endapan sel pada kultur suspensi sel perlakuan SA dan MJ. Elisitasi SA dan MJ pada kultur suspensi sel mempengaruhi warna endapan sel setelah disentrifugasi (PCV) (Gambar 15). Endapan sel yang terbentuk menunjukkan warna kuning kecoklatan pada kontrol dan kuning kehitaman hingga kecoklatan pada perlakuan elisitor. Pemberian elisitor SA lebih cenderung berwarna kecoklatan dibandingkan dengan perlakuan dengan elisitor MJ.



Gambar 14. Pengaruh pemberian elisitor SA dan MJ terhadap volume endapan sel (SCV) kultur suspensi sel jintan hitam (*Nigella sativa* L.)

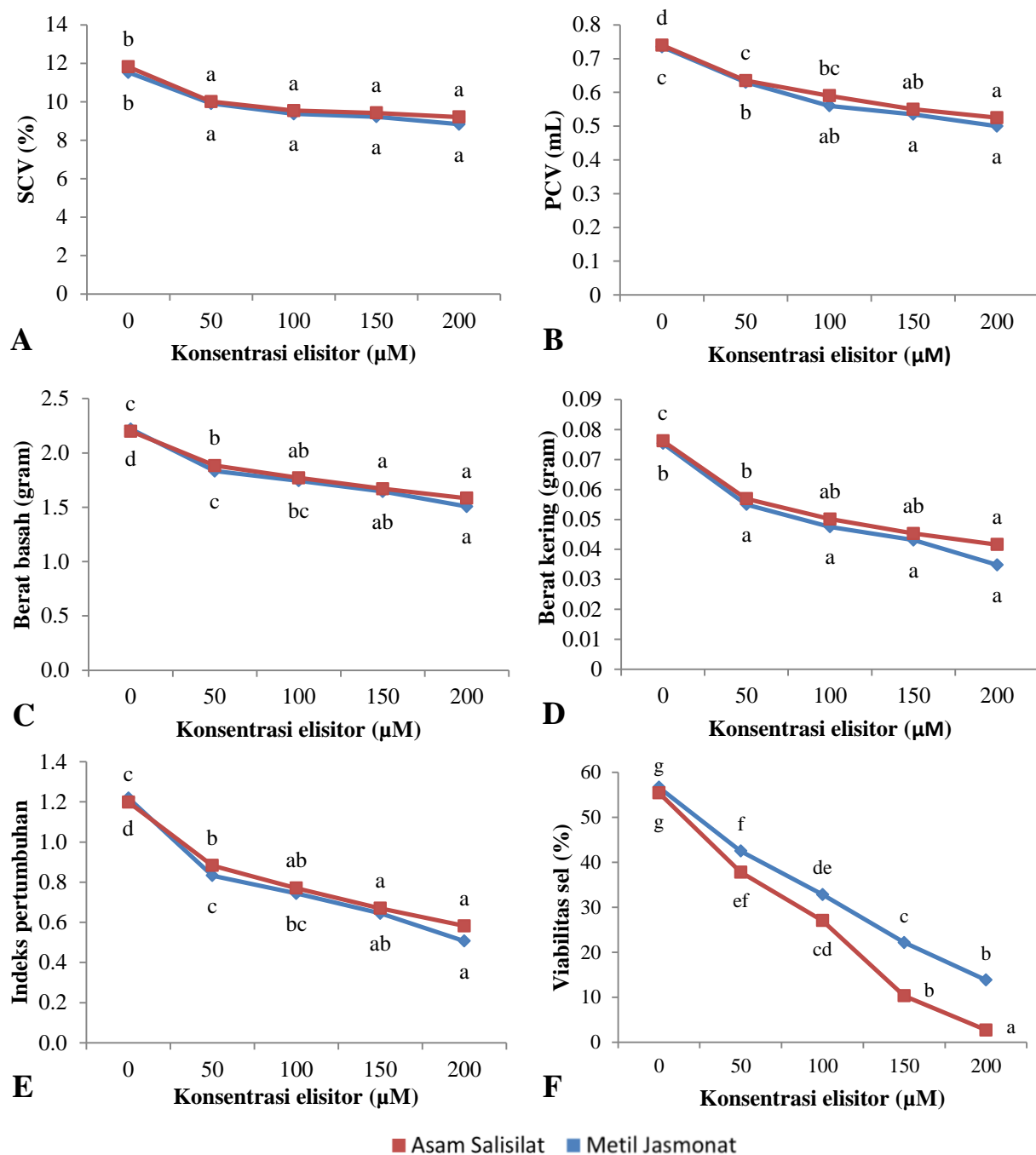
Kultur suspensi sel dengan penambahan elisitor SA 100 μM menunjukkan warna endapan sel kecoklatan, sedangkan pada perlakuan SA 200 μM sel yang dihasilkan berwarna coklat. Perlakuan menggunakan elisitor MJ menunjukkan warna endapan sel kuning kecoklatan, ditunjukkan pada perlakuan MJ 50 - 100 μM . Perubahan warna endapan sel akan semakin gelap dengan bertambahnya konsentrasi elisitor MJ.



Gambar 15. Pengaruh pemberian elisitor SA dan MJ terhadap volume sel setelah sentrifugasi (PCV) kultur suspensi sel jintan hitam (*Nigella sativa* L.)

Pemberian elisitor SA dan MJ pada kultur suspensi sel selama 14 hari berpengaruh terhadap pertumbuhan kultur suspensi sel jintan hitam. Hasil ANOVA dua arah menunjukkan bahwa SCV, PCV, berat basah, berat kering dan indeks pertumbuhan kultur sel jintan hitam dipengaruhi oleh konsentrasi elicitor tetapi tidak dipengaruhi oleh jenis elisitor dan interaksi antara jenis elisitor dan konsentrasi elisitor. Elisitasi dengan menggunakan SA dan MJ pada kultur suspensi sel secara signifikan menurunkan SCV, PCV, berat basah sel, berat kering sel, indeks pertumbuhan dan viabilitas sel (Gambar 16). Semakin tinggi konsentrasi elisitor semakin besar penghambatan pertumbuhan kultur suspensi sel dan penurunan viabilitas sel.

Pemberian elisitor SA dan MJ pada medium menurunkan persentase SCV pada kultur suspensi sel (Lampiran 5: LT 5.2), namun persentase SCV pada kultur suspensi sel hasil elisitasi dari kedua jenis elisitor tidak berbeda secara signifikan. Kultur suspensi sel pada kontrol menunjukkan persentase SCV sekitar 12%, sedangkan persentase SCV pada kultur suspensi sel dengan pemberian elisitor SA dan MJ konsentrasi 50 - 200 μM berkisar antara 8,8-10,0 %. Tidak ada perbedaan signifikan pada persentase SCV dari kultur suspensi sel pada beberapa konsentrasi elisitor (Gambar 16 A).



Gambar 16. Pengaruh pemberian elisitor SA dan MJ terhadap pertumbuhan kultur suspensi sel jintan hitam (*Nigella sativa* L.) setelah 10 hari kultur

Keterangan: (A) volume endapan sel (SCV), (B) volume sel setelah disentrifugasi (PCV), (C) berat basah (BB), (D) berat kering (BK), (E) indeks pertumbuhan dan (F) persentase viabilitas sel

Notasi huruf yang sama pada jenis elisitor yang sama pada parameter SCV, PCV, BB, BK dan IP menunjukkan tidak ada pengaruh signifikan antara konsentrasi yang berbeda. Notasi yang sama pada parameter viabilitas sel menunjukkan tidak ada pengaruh signifikan antara interaksi jenis elisitor dan konsentrasi yang berbeda (DMRT $P < 0.05$)

Packed cell volume dari kultur suspensi sel jantan hitam dipengaruhi oleh konsentrasi elisitor tetapi tidak dipengaruhi oleh jenis elisitor SA dan MJ (Lampiran 5: LT 5.3). Elisitor SA dan MJ menurunkan PCV pada kultur suspensi sel jantan hitam. Penurunan PCV mulai terjadi pada pemberian elisitor konsentrasi 50 μ M. Semakin tinggi konsentrasi elisitor (50-200 μ M), penurunan PCV semakin meningkat (Gambar 16 B). *Packed cell volume* pada kultur suspensi sel tanpa elisitasi sebesar 0,74 mL. Pada kultur suspensi dengan elisitasi SA dan MJ 50 μ M sebesar 0,64 mL dan 0,63 mL, sedangkan pada kultur suspensi dengan elisitor SA dan MJ 200 μ M sebesar 0,53 mL dan 0,50 mL.

Pemberian elisitor SA dan MJ pada medium menurunkan berat basah sel pada kultur suspensi sel (Lampiran 5: LT 5.4), namun berat basah sel pada kultur suspensi sel hasil elisitasi dari kedua jenis elisitor tidak berbeda secara signifikan. Kultur suspensi sel tanpa pemberian elisitor menunjukkan berat basah sel sekitar 2,2 gram, sedangkan berat basah sel pada kultur suspensi sel dengan pemberian elisitor SA dan MJ konsentrasi 50 - 200 μ M berkisar antara 1,8 gram - 1,5 gram. Tidak ada perbedaan signifikan pada berat basah sel dari kultur suspensi sel pada beberapa konsentrasi elisitor (Gambar 16 C).

Berat kering sel pada kultur suspensi sel jantan hitam dipengaruhi oleh konsentrasi elisitor tetapi tidak dipengaruhi oleh jenis elisitor (SA dan MJ). Elisitor SA dan MJ pada media dapat menyebabkan penurunan berat kering sel (Lampiran 5: LT 5.5). Berat kering sel tanpa perlakuan elisitor diperoleh sebesar 0,0758 gram. Pada elisitor SA 50-150 μ M terjadi penurunan berat kering sel dan tidak menunjukkan beda nyata, namun mulai terlihat berbeda nyata pada konsentrasi 200 μ M. penambahan elisitor MJ 50-200 μ M tidak menunjukkan berbeda nyata terhadap penurunan berat kering sel.

Indeks pertumbuhan pada kultur suspensi sel jantan hitam dipengaruhi oleh konsentrasi elisitor tetapi tidak dipengaruhi oleh jenis elisitor (Lampiran 5: LT 5.5). Elisitor SA dan MJ menyebabkan penurunan IP pada kultur suspensi sel jantan hitam. Penurunan IP mulai terjadi pada pemberian elisitor konsentrasi 50 μ M. Semakin tinggi konsentrasi elisitor (50-200 μ M) maka semakin menurunkan IP (Gambar 16 E). Indeks pertumbuhan pada kultur suspensi sel tanpa elisitor sebesar 1,2. Pada kultur suspensi dengan elisitor SA dan MJ 50 μ M sebesar 0,89 dan 0,83, sedangkan pada kultur suspensi dengan elisitor SA dan MJ 200 μ M sebesar 0,58 dan 0,51.

Viabilitas sel pada kultur suspensi sel jantan hitam dipengaruhi oleh konsentrasi elisitor dan jenis elisitor (Lampiran 5: LT 5.5). interaksi antara konsentrasi dan jenis elisitor menyebabkan penurunan viabilitas sel pada kultur suspensi sel jantan hitam. Elisitor SA dan MJ dapat berpengaruh secara signifikan terhadap viabilitas sel pada kultur suspensi

sel. Konsentrasi SA dan MJ mampu memberikan hasil yang berbeda secara signifikan. (Lampiran 5: LT 5.7). Rata-rata viabilitas sel pada kultur suspensi sel kontrol menghasilkan persentase 56%. Elisitor SA cenderung menunjukkan viabilitas sel yang menurun secara signifikan pada setiap peningkatan konsentrasi yang diberikan. Elisitor SA konsentrasi 50 dan 100 μM menghasilkan viabilitas sel sebanyak 37,8 dan 27,0 %, sedangkan elisitor MJ dengan konsentrasi 50 dan 100 μM menunjukkan viabilitas sel 42,5 % dan 32,8 %. Rata-rata viabilitas sel pada perlakuan SA dan MJ mulai menunjukkan perbedaan yang signifikan pada konsentrasi 150 - 200 μM (Lampiran 6: LT. 6.4 dan LT. 6.5) Pada perlakuan SA 150 μM viabilitas sel terlihat sangat rendah hanya mencapai 10,29 % sedangkan pada MJ 150 μM memiliki lebih banyak persentase sel yang hidup sebesar 24,94 %, pada konsentrasi SA 200 μM hanya diperoleh rata-rata sel yang masih hidup sebesar 2,8% dari total sel dalam satu bidang pandang, sedangkan pada MJ 200 μM diperoleh rata-rata sel hidup lebih tinggi 13,7% dibandingkan perlakuan SA 200 μM . bahkan viabilitas sel pada perlakuan MJ 200 μM juga lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan SA 150 μM .

Perbedaan warna endapan kultur suspensi sel pada pengamatan PCV yang menunjukkan warna sel kuning-kecoklatan hingga coklat-kehitaman pada setiap peningkatan konsentrasi elisitor dapat mengindikasikan bahwa endapan sel kultur suspensi mengandung banyak sel yang mati. Tingkat kematian sel yang tinggi pada perlakuan SA juga ditunjukkan pada pengamatan viabilitas sel. Hal ini dijelaskan pada penelitian terdahulu menyatakan pencoklatan (*browning*) pada kultur suspensi sel dan kultur kalus pada media padat dapat menyebabkan penurunan viabilitas sel, penurunan kemampuan regenerasi, pertumbuhan yang buruk, dan bahkan kematian (He dkk., 2009; Li dkk., 2016).

Konsentrasi elisitor yang tinggi dapat menurunkan viabilitas sel dengan ditandai perubahan warna pada kultur suspensi sel jintan hitam, hal ini diperkuat oleh pernyataan Gadzovska dkk. (2012) bahwa konsentrasi SA 50 dan 250 μM , dapat menyebabkan viabilitas kultur suspensi sel menurun masing-masing hingga 20% dan 35%. Perlakuan elisitasi SA pada kalus dengan warna hijau dapat berubah menjadi warna merah dan kecoklatan dengan konsentrasi 100 μM selama minggu terakhir kultur. Viabilitas sel yang menurun setelah perlakuan elisitasi jasmonat juga telah dilaporkan oleh Sák dkk. (2021) bahwa viabilitas sel dalam kultur dengan pemberian elisitor jasmonat menurun seiring waktu. Pada awal pengamatan yaitu pada hari ke-6 subkultur pasca ke media baru sebesar 90%. Viabilitas menurun setelah diberi perlakuan elisitasi menggunakan MJ menjadi 84 - 79%.

Mustafa dkk. (2011) menyatakan pada akhir fase lag hingga fase eksponensial, persentase SCV sel meningkat kemudian penurunan laju pertumbuhan diamati bersamaan dengan pencoklatan kultur suspensi sel. Sebelum dilakukan perlakuan elisitasi kultur suspensi sel disubkultur dua kali selanjutnya diberi perlakuan elisitasi kultur suspensi sel dengan menggunakan media yang sama namun dengan penambahan elisitor. Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang menyatakan kultur suspensi sel sebelum dilakukan perlakuan elisitasi, sebaiknya disubkultur pada media baru sebanyak dua kali hingga sel-sel homogen. Subkultur suspensi sel dilakukan setiap 9-10 hari sekali (Alemi dkk., 2013; Srinivasan, 2018).

Pertumbuhan kultur suspensi sel *Sorgum bicolor* dalam kondisi gelap pada penelitian Ramulifho dkk. (2019) menunjukkan fase eksponensial meningkat hingga hari ke-10, sedangkan fase stasioner pada hari ke-10 hingga ke-14. Penentuan fase awal stasioner yang digunakan dalam penentuan waktu subkultur dan waktu perlakuan elisitasi disebabkan pada fase ini kandungan metabolit sekunder pada konsentrasi tertinggi. Menurut Khanpour-Ardestani dkk. (2015) menyatakan bahwa kandungan asetosida dalam kultur suspensi sel *Scrophularia striata* meningkat selama fase pertumbuhan eksponensial dan optimal pada fase puncak/ awal fase diam pada hari ke-15. Kandungan maksimum acetoside diperoleh pada awal fase diam sebanyak 14,25 $\mu\text{g/g}$ BB. Hal ini didukung juga oleh penelitian sebelumnya, menurut Beigmohamadi dkk. (2019) pada kultur suspensi sel *Plumbago europaea* L. dengan penambahan 0,5 mg/L NAA + 2 mg/L BA pada hari ke-18 awal fase stasioner mengandung plumbagin maksimal 0,9 mg/g BK pada kultur suspensi sel yang diinkubasi di bawah kondisi gelap. Penelitian terdahulu pada kultur suspensi sel jintan hitam dari eksplan epikotil dengan media MS + NAA 1 mg/L + Kinetin 2 mg/L yang diinkubasi pada suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$ dengan fotoperiode 16/8 pada 110 rpm menunjukkan kurva pertumbuhan sigmoid. Kurva pertumbuhan diperoleh fase stasioner yang panjang diperoleh pada hari ke-19 hingga hari ke-31 setelah inisiasi. Kurva pertumbuhan menurun perlahan pada hari ke-20 hingga akhir pengamatan. Pada kultur suspensi sel jintan hitam pada perlakuan media NAA 1 mg/L + Kinetin 2 mg/L juga dilaporkan terjadi peningkatan persentase terpenoid non-polar 11,5% (Chaudhry dkk., 2014b).

Pemberian elisitor SA dan MJ berpengaruh tidak signifikan terhadap penurunan biomassa kultur suspensi sel jintan hitam. Walaupun tidak berpengaruh secara signifikan, elisitor MJ tampak cenderung lebih menghambat dibandingkan dengan elisitor SA. Pada parameter viabilitas sel, elisitor SA dan MJ memberikan pengaruh yang berbeda secara signifikan, demikian juga untuk konsentrasi dan interaksi konsentrasi-jenis elisitor

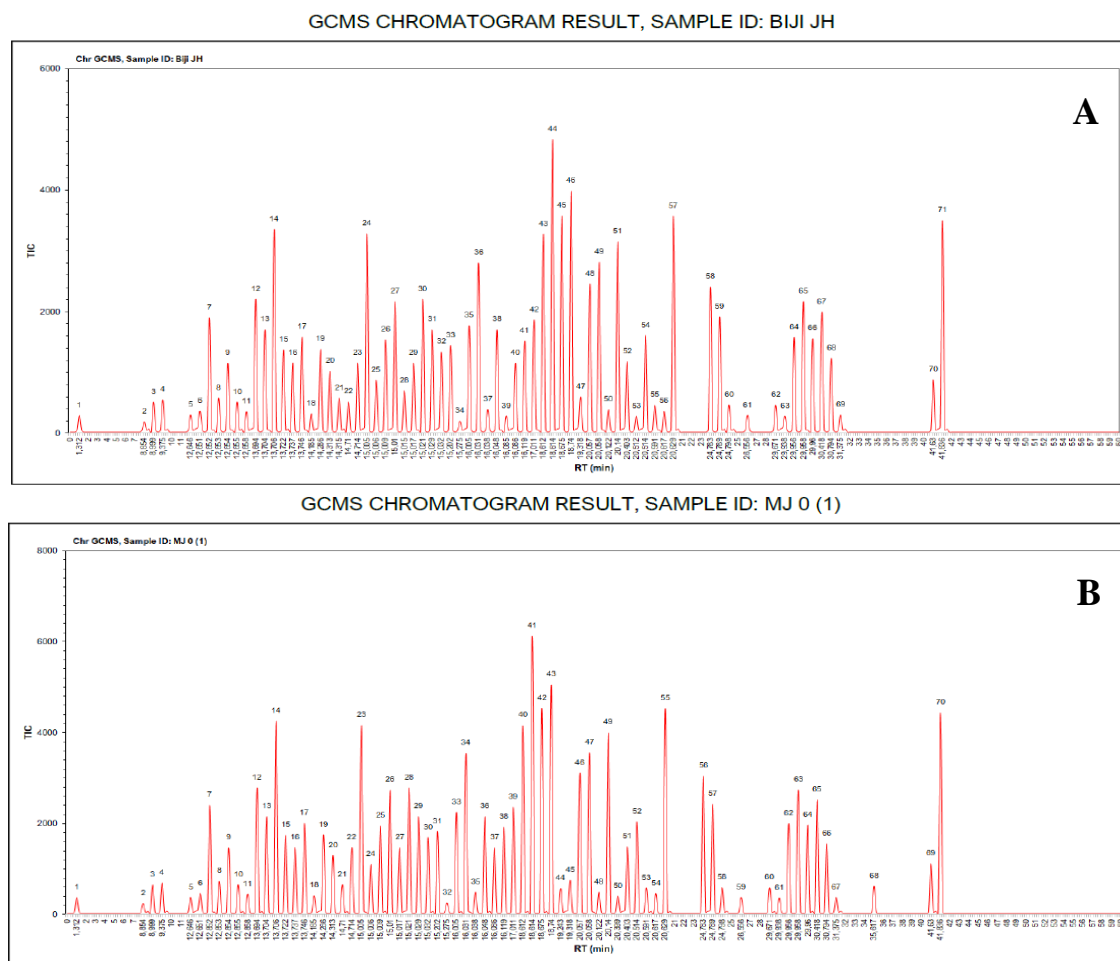
(Lampiran 5). Pertumbuhan sel terhambat dan berkurangnya biomassa pada kultur suspensi sel setelah elisitasi dengan SA dan MJ juga dilaporkan Mendoza dkk. (2018) pada kultur suspensi *Thevetia peruviana*. Penambahan SA 300 μ M dan MJ 3 μ M selama 96 jam dapat menurunkan berat kering sel sebanyak 0,51 gram/L dan 2,92 gram/L dibandingkan dengan kontrol. Pada kultur suspensi sel *Cannabis sativa*, elisitor SA tidak menurunkan laju pertumbuhan maupun viabilitas sel secara signifikan, sedangkan penambahan elisitor JA dan MJ menyebabkan penurunan laju pertumbuhan kultur suspensi sel *Cannabis sativa*. Kultur suspensi sel yang diberi perlakuan MJ menunjukkan penurunan indeks pertumbuhan sebesar 20-23% setelah 4 hari kultur. Perlakuan penambahan MJ pada media kultur sel menunjukkan penurunan laju pertumbuhan dan biomassa (Gabotti dkk., 2019).

Penambahan elisitor SA pada kultur suspensi sel jintan hitam menunjukan tingkat kematian yang lebih tinggi dibandingkan dengan elisitor MJ. Pada konsentrasi 100 μ M menunjukan perbedaan viabilitas sel yang signifikan pada kedua elisitor. Hal ini disebabkan elisitor SA selain menginduksi peningkatan senyawa metabolit sekunder pada sel juga dapat menyebabkan tingkat nekrosis yang tinggi pada sel tumbuhan sebagai bentuk pertahanan diri dari patogen. Asam salisilat terlibat dalam induksi *Programmed Cell Death* (PCD) sel mati terprogram yang terkait dengan respons pertahanan patogen karena kadar SA meningkat sebagai respons terhadap infeksi yang memicu PCD (Brodersen dkk., 2005). Asam salisilat dapat memberikan respon hipersensitif (HR) terhadap patogen yang menyerang. Mekanisme HR dipicu secara lokal pada serangan patogen untuk menginduksi respon pertahanan yang menyebabkan kematian sel yang terinfeksi. Akumulasi SA yang berpengaruh pada HR menunjukkan bahwa SA berkontribusi untuk mengontrol waktu dan luasnya kematian sel (Alvarez, 2000).

Elisitor MJ menyebabkan tingkat kematian yang lebih rendah dari elisitor SA, namun biomassa hasil perlakuan MJ lebih sedikit dibanding SA. Menurut penelitian terdahulu, Hasil ini mungkin disebabkan oleh fakta bahwa nekrosis yang disebabkan oleh stres dapat dipulihkan dengan peningkatan konsentrasi MJ eksogen (Balusamy dkk., 2015). Penambahan elisitor JA dan MJ eksogen menyebabkan pertumbuhan terhambat pada tanaman *in vivo* maupun kultur suspensi sel, hal ini disebabkan JA dan MJ dapat menekan pembelahan sel (mitosis) (Gabotti dkk., 2019). Efek utama JA/MJ eksogen pada siklus sel. Asam jasmonat dapat menyebabkan penahanan sel dalam fase G1 dan G2, meningkatkan jumlah sel yang tertahan di fase G0 dan G1, dan menurunkan jumlah sel yang memasuki fase S dan G2 (Kamińska, 2021).

4.3 Profil Komponen dan Kadar Minyak Atsiri Jintan Hitam pada Kultur Suspensi Sel Hasil Elisitasi dengan Asam Salisilat dan Metil Jasmonat

Hasil analisis GC-MS pada biji dan kultur suspensi sel jintan hitam menunjukkan bahwa pada kedua sampel mempunyai komponen minyak atsiri jintan hitam yang hampir sama. Jumlah komponen senyawa minyak atsiri pada biji teridentifikasi sebanyak 71 komponen dan pada kultur suspensi sel teridentifikasi 70 komponen (Gambar 17).



Gambar 17. Kromatogram komponen senyawa minyak biji jintan hitam dan kultur suspensi sel kontrol. Keterangan: (A) biji jintan hitam dan (B) kultur suspensi sel jintan hitam

Komponen utama minyak jintan hitam pada biji dan kultur suspensi sel teridentifikasi komponen senyawa yang sama berupa *p*-cymene, α -thujene, β -pinene, thymol dan thymoquinone. Pada biji jintan hitam senyawa yang tidak ditemukan adalah octen-1-ol, acetate, Calacorene dan 1,5-dimethyl 1 vinyl 4 hexenyl butyrate. Kultur suspensi sel jintan hitam tidak ditemukan senyawa Phellandral, 4-hexen-1-ol, 5-methyl-2-(1-methylethenyl),(R), Calamine dan spiro [5.5] undec-2-ene, 3, 7, 7- trimethyl – 11 - methylene(-).

Komponen senyawa minyak jintan hitam pada biji dan kultur suspensi sel terdapat 10 senyawa dominan antara lain *thymoquinone* (4,700 % pada biji dan 4,722 % pada suspensi), *trans – 4 - methoxythujane* (3,877% pada biji dan 3,895% pada suspensi), *thymohydroquinone* (3,481% pada biji dan 3,497% pada suspensi), *dithymoquinone* (3,407% pada biji dan 3,422% pada suspensi), *β-pinene* (3,265 % pada biji dan 3,280 % pada suspensi), *thymol* (3,194% pada biji dan 3,209% pada suspensi), *2-methyl-5-(1-methylethyl) –2,5-cyclohexadiene-1,4 –dione* (3,191% pada biji dan 3,206%), *myristicin* (3,068% pada biji dan 3,082% pada suspensi), *n-tetradecane* (2,736% pada biji dan 2,749% pada suspensi) dan *4-terpineol* (2,727 % pada biji dan 2,739 % pada suspensi) (Tabel 1).

Senyawa utama pada biji dan kultur suspensi sel secara berturut-turut meliputi *Thymoquinone* (4,700% pada biji dan 4,722% pada biji), *thymol* (3,194% pada biji dan 3,209% pada biji), *β-pinene* (3,265% pada biji dan 3,280% pada biji), *α-thujene* (2,145% pada biji dan 2,154% pada biji) dan *p-cymene* (0,535 % pada biji dan 0,537% pada biji). Komponen utama minyak jintan hitam dari biji dan kultur suspensi sel merupakan senyawa yang dominan dan memiliki kelimpahan yang tinggi. Secara umum kelimpahan senyawa dominan maupun senyawa utama pada kultur suspensi sel jintan hitam lebih tinggi dibandingkan pada biji jintan hitam (Tabel 1).

Tabel 1. Komponen kimia minyak jintan hitam hasil analisis GC-MS pada biji dan kultur suspensi sel

No.	Komponen Senyawa	RT (min)	Rumus Molekul	Kelimpahan (%)	
				Biji	Kultur suspensi sel
1	Cyclosativene	1,312	C ₁₅ H ₂₄	0,286	0,287
2	Nonane	8,854	C ₉ H ₂₀	0,184	0,185
3	Mesitylene	8,999	C ₉ H ₁₂	0,500	0,503
4	p-cymene*	9,375	C ₁₀ H ₁₄	0,535	0,538
5	1,5,8-r-menthatriene	12,646	C ₁₀ H ₁₄	0,292	0,293
6	1-ethyl-2,3-dimethyl benzene	12,651	C ₁₀ H ₁₄	0,358	0,360
7	α-phellandrene	12,852	C ₁₀ H ₁₆	1,844	1,853
8	1-methyl-2-(1-methylethyl)benzene	12,853	C ₁₀ H ₁₄	0,564	0,567
9	2-methyl-5(1-methyl ethyl)-bicyclo[3.1.0] hex-2-ene	12,854	C ₁₀ H ₁₆	1,125	1,131
10	Anisaldehyde	12,855	C ₈ H ₈ O ₂	0,502	0,504
11	1-methyl-3-propyl benzene	12,858	C ₁₀ H ₁₄	0,346	0,348
12	α-thujene*	13,694	C ₁₀ H ₁₆	2,145	2,156
13	α-pinene	13,704	C ₁₀ H ₁₆	1,656	1,665

Keterangan: (*): komponen senyawa utama

Lanjutan tabel 1

No.	Komponen Senyawa	RT (min)	Rumus Molekul	Kelimpahan (%)	
				Biji	Kultur suspensi sel
14	β-pinene*	13,706	C ₁₀ H ₁₆	3,265	3,282
15	Camphene	13,722	C ₁₀ H ₁₆	1,340	1,347
16	Myrcene	13,737	C ₁₀ H ₁₆	1,130	1,136
17	Limonene	13,746	C ₁₀ H ₁₆	1,540	1,548
18	α-ocimene	14,185	C ₁₀ H ₁₆	0,316	0,300
19	γ-terpinene	14,286	C ₁₀ H ₁₆	1,347	1,354
20	3-methyl nonane	14,313	C ₁₀ H ₂₂	0,997	1,003
21	n-decane	14,315	C ₁₀ H ₂₂	0,565	0,567
22	Anethole	14,710	C ₁₀ H ₁₂ O	0,502	0,505
23	Estragole	14,714	C ₁₀ H ₁₂ O	1,129	1,135
24	Thymol*	15,005	C ₁₀ H ₁₄ O	3,194	3,211
25	2-(4-methylphenyl) propan-2-ol	15,006	C ₁₀ H ₁₄ O	0,850	0,855
26	2-methyl-5-(1-methyl ethyl)phenol	15,009	C ₁₀ H ₁₄ O	1,497	1,505
27	Carvacrol	15,010	C ₁₀ H ₁₄ O	2,105	2,116
28	Ocimenone	15,015	C ₁₀ H ₁₄ O	0,680	0,683
29	Pinocarvone	15,017	C ₁₀ H ₁₄ O	1,127	1,134
30	Carvone	15,009	C ₁₀ H ₁₄ O	2,145	2,156
31	(4E)-7-methyl-3- methylideneocta-4,6-dien-2-ol	15,029	C ₁₀ H ₁₆ O	1,656	1,665
32	Dihydrocarvone	15,032	C ₁₀ H ₁₆ O	1,303	1,310
33	Fenchone	15,202	C ₁₀ H ₁₆ O	1,404	1,411
34	Phellandral	15,275	C ₁₀ H ₁₆ O	0,193	-
35	Sabinene	16,005	C ₁₀ H ₁₆ O	1,726	1,735
36	4-terpineol	16,031	C ₁₀ H ₁₈ O	2,727	2,741
37	4-hexen-1-ol, 5-methyl-2-(1-methylethenyl),(R)	16,038	C ₁₀ H ₁₈ O	0,378	-
38	Borneol	16,048	C ₁₀ H ₁₈ O	1,656	1,665
39	3-cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1(1 methylethyl),(R)	16,085	C ₁₀ H ₁₈ O	0,277	0,248
40	4-methyl-1-(1-methyl ethyl)-3-cyclohexen-1-ol	16,086	C ₁₀ H ₁₈ O	1,126	1,132
41	Linalool	16,119	C ₁₀ H ₁₈ O	1,478	1,486
42	Citronellol	17,011	C ₁₀ H ₂₀ O	1,814	1,824
43	2-methyl-5-(1-methylethyl)-2,5- cyclohexadiene-1,4-dione	18,612	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	3,191	3,208
44	Thymoquinone*	18,614	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	4,700	4,725
45	Thymohydroquinone	18,675	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	3,481	3,499
46	trans-4-methoxythujane	18,740	C ₁₁ H ₂₀ O	3,877	3,897
47	octen-1-ol, acetate	19,243	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	-	0,418
48	Hexyl butyrate	19,318	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	0,582	0,553
49	Damascenine	20,057	C ₁₀ H ₁₃ NO	2,390	2,403
50	n-tetradecane	20,058	C ₁₀ H ₃₄	2,736	2,751
51	2,6-octadien-1-ol,-3,7- dimethyl, acetate,(Z)	20,122	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0,378	0,359
52	Myristicin	20,140	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	3,068	3,084

Keterangan: (*): komponen senyawa utama

Lanjutan tabel 1

No.	Komponen Senyawa	RT (min)	Rumus Molekul	Kelimpahan (%)	
				Biji	Kultur suspensi sel
53	Calacorene	20,399	C ₁₅ H ₂₀	-	0,298
54	n-octyl isobutyrate	20,403	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	1,147	1,153
55	Calamine	20,512	C ₁₅ H ₂₂	0,277	-
56	2,6,6,9-tetramethyl tricycle [5.4.0.0(2,8)] undec-9-ene	20,514	C ₁₅ H ₂₄	1,569	1,577
57	β -elemene	20,591	C ₁₅ H ₂₄	0,449	0,427
58	Germacrene D	20,617	C ₁₅ H ₂₄	0,355	0,337
59	Longifolene	20,629	C ₁₅ H ₂₄	3,477	3,495
60	Aromadendrene	24,783	C ₁₅ H ₂₄	2,339	2,351
61	decahydro-4,8,8-trimethyl-9- methylene-1,4-methanoazulene	24,789	C ₁₅ H ₂₄	1,865	1,875
62	α -selinene	24,798	C ₁₅ H ₂₄	0,454	0,431
63	t-muurolol	26,556	C ₁₅ H ₂₆ O	0,287	0,278
64	di-epi- α -cedrene	29,671	C ₁₅ H ₂₄	0,450	0,427
65	spiro[5.5]undec-2-ene,3,7,7- trimethyl-11-methylene,(-)	29,938	C ₁₅ H ₂₄	0,276	-
66	α -copaene	29,956	C ₁₅ H ₂₄	1,534	1,542
67	α -longicyclene	29,958	C ₁₅ H ₂₄	2,106	2,117
68	α -longipinene	29,960	C ₁₅ H ₂₄	1,517	1,525
69	Apiol	30,418	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	1,937	1,948
70	n-hexadecane	30,794	C ₁₆ H ₃₄	1,200	1,206
71	α -cadinol	31,375	C ₁₅ H ₂₆ O	0,291	0,277
72	1,5-dimethyl 1 vinyl 4 hexenyl butyrate	35,617	C ₁₄ H ₂₄ O ₂	-	0,458
73	pimara-8(14),15-diene	41,630	C ₂₀ H ₃₂	0,857	0,862
74	Dithymoquinone	41,836	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	3,407	3,424

Keterangan: (*): komponen senyawa utama

Hasil analisis GC-MS pada kultur suspensi sel jintan hitam hasil perlakuan elisitasi dengan SA dan MJ menunjukkan jumlah komponen senyawa minyak atsiri yang bervariasi (Tabel 2). Jumlah komponen minyak atsiri jintan hitam pada kultur suspensi sel hasil pemberian elisitor MJ 50 μ M sebanyak 71 komponen, pada pemberian elisitor SA 50 μ M dan 200 μ M sebanyak 72 komponen dan pemberian elisitor SA 100 -150 μ M serta MJ 100-200 μ M sebanyak 74 komponen (Lampiran 7). Komponen senyawa yang tidak teridentifikasi pada perlakuan SA 50 μ M adalah α -ocimene dan t-muurolol, sedangkan pada perlakuan SA 200 μ M senyawa yang tidak teridentifikasi adalah 3-cyclohexen-1-ol, 4-methyl- 1(1 methylethyl),(R) dan octen-1-ol, acetate. Komponen senyawa yang tidak teridentifikasi pada perlakuan MJ 50 μ M Phellandral, 3-cyclohexen-1-ol, 4-methyl- 1(1 methylethyl),(R) dan Calamine.

Tabel 2. Komponen kimia minyak jintan hitam hasil analisis GC-MS kultur suspensi sel hasil elisitasi dengan SA dan MJ

No	Komponen Senyawa	Kelimpahan (%)									
		Biji	Kontrol	Asam salisilat (μM)				Metil jasmonat (μM)			
				50	100	150	200	50	100	150	200
1	Cyclosativene	0,286	0,287	0,284	0,282	0,282	0,284	0,284	0,282	0,280	0,282
2	Nonane	0,184	0,185	0,183	0,181	0,182	0,183	0,183	0,182	0,180	0,182
3	Mesitylene	0,500	0,503	0,497	0,494	0,494	0,497	0,498	0,494	0,545	0,494
4	p-cymene*	0,535	0,538	0,531	0,528	0,528	0,532	0,532	0,528	0,579	0,528
5	1,5,8-r-menthatriene	0,292	0,293	0,290	0,288	0,288	0,290	0,290	0,288	0,286	0,288
6	1-ethyl-2,3-dimethyl benzene	0,358	0,360	0,356	0,353	0,353	0,356	0,356	0,354	0,351	0,353
7	α -phellandrene	1,844	1,853	1,832	1,822	1,822	1,835	1,835	1,822	1,806	1,821
8	1-methyl-2-(1-methylethyl) benzene	0,564	0,567	0,560	0,557	0,557	0,561	0,561	0,557	0,552	0,557
9	2-methyl-5(1-methyl ethyl)-bicyclo[3.1.0] hex-2-ene	1,125	1,131	1,118	1,111	1,111	1,119	1,119	1,111	1,213	1,111
10	Anisaldehyde	0,502	0,504	0,498	0,495	0,495	0,499	0,499	0,496	0,491	0,495
11	1-methyl-3-propyl benzene	0,346	0,348	0,344	0,342	0,342	0,345	0,345	0,342	0,339	0,342
12	α -thujene*	2,145	2,156	2,131	2,118	2,118	2,134	2,134	2,119	2,101	2,118
13	α -pinene	1,656	1,665	1,646	1,636	1,636	1,648	1,648	1,637	1,622	1,636
14	β -pinene*	3,265	3,282	3,244	3,225	3,225	3,248	3,249	3,226	3,198	3,225
15	Camphene	1,340	1,347	1,332	1,324	1,324	1,333	1,333	1,324	1,313	1,324
16	Myrcene	1,130	1,136	1,123	1,116	1,116	1,124	1,124	1,116	1,107	1,116
17	Limonene	1,540	1,548	1,530	1,521	1,521	1,532	1,532	1,521	1,508	1,521
18	α -ocimene	0,316	0,300	-	0,312	0,312	0,315	0,315	0,312	0,310	0,312
19	γ -terpinene	1,347	1,354	1,339	1,331	1,331	1,340	1,341	1,331	1,320	1,331
20	3-methyl nonane	0,997	1,003	0,991	0,985	0,985	0,992	0,992	0,985	0,977	0,985
21	n-decane	0,565	0,567	0,561	0,558	0,558	0,562	0,562	0,528	0,553	0,558
22	Anethole	0,502	0,505	0,499	0,496	0,496	0,499	0,499	0,496	0,492	0,496
23	Estragole	1,129	1,135	1,122	1,115	1,115	1,123	1,124	1,116	1,106	1,115
24	Thymol*	3,194	3,211	3,174	3,155	3,155	3,178	3,179	3,156	3,129	3,155
25	2-(4-methylphenyl) propan-2-ol	0,850	0,855	0,845	0,840	0,840	0,846	0,846	0,840	0,833	0,840
26	2-methyl-5-(1-methylethyl) phenol	1,497	1,505	1,487	1,478	1,478	1,489	1,489	1,479	1,466	1,478
27	Carvacrol	2,105	2,116	2,092	2,079	2,079	2,094	2,095	2,080	2,062	2,079
28	Ocimenone	0,680	0,683	0,676	0,672	0,672	0,677	0,677	0,672	0,666	0,672
29	Pinocarvone	1,127	1,134	1,120	1,114	1,114	1,122	1,122	1,114	1,104	1,114
30	Carvone	2,145	2,156	2,131	2,119	2,119	2,134	2,134	2,119	2,101	2,119
31	(4E)-7-methyl-3-Methylideneocta -4,6- dien-2-ol	1,656	1,665	1,646	1,636	1,636	1,648	1,648	1,637	1,622	1,636
32	Dihydrocarvone	1,303	1,310	1,295	1,287	1,287	1,297	1,297	1,288	1,277	1,287
33	Fenchone	1,404	1,411	1,395	1,387	1,387	1,397	1,397	1,387	1,375	1,387
34	Phellandral	0,193	-	0,192	0,191	0,191	0,192	-	0,191	0,189	0,191
35	Sabinene	1,726	1,735	1,716	1,705	1,705	1,717	1,718	1,706	1,691	1,705
36	4-terpineol	2,727	2,741	2,710	2,694	2,694	2,713	2,714	2,695	2,672	2,694
37	4-hexen-1-ol, 5-methyl-2-(1-methylethenyl),(R)	0,378	-	0,376	0,374	0,374	0,376	0,376	0,374	0,370	0,373

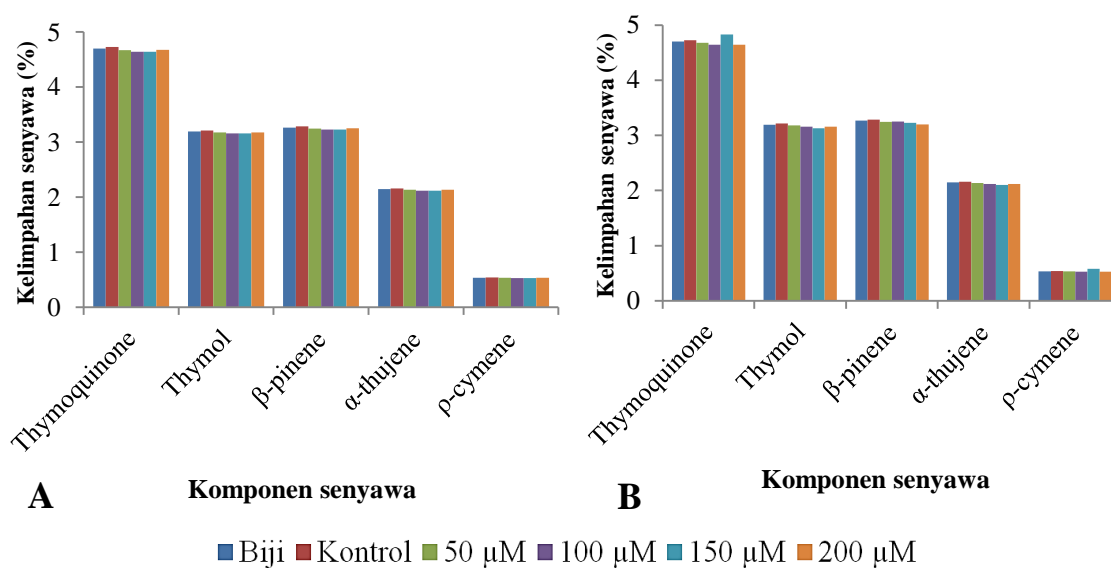
Keterangan: (*): komponen senyawa utama

Lanjutan tabel 2

No.	Komponen Senyawa	Kelimpahan (%)									
		Biji	Kontrol	Asam salisilat (µM)				Metil jasmonat (µM)			
				50	100	150	200	50	100	150	200
38	Borneol	1,656	1,665	1,646	1,636	1,636	1,648	1,648	1,637	1,622	1,636
39	3-cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1(1 methylethyl),(R)	0,277	0,248	0,276	0,274	0,274	-	-	0,274	0,272	0,274
40	4-methyl-1-(1-methyl ethyl)-3-cyclohexen-1-ol	1,126	1,132	1,119	1,112	1,112	1,120	1,121	1,113	1,103	1,112
41	Linalool	1,478	1,486	1,469	1,460	1,460	1,471	1,471	1,461	1,448	1,460
42	Citronellol	1,814	1,824	1,803	1,792	1,792	1,805	1,805	1,793	1,777	1,792
43	2-methyl-5-(1-methylethyl)-2,5- cyclohexadiene-1,4-dione	3,191	3,208	3,171	3,152	3,152	3,175	3,176	3,153	3,126	3,152
44	Thymoquinone*	4,700	4,725	4,671	4,643	4,643	4,676	4,678	4,644	4,827	4,643
45	Thymohydroquinone	3,481	3,499	3,459	3,438	3,438	3,463	3,464	3,439	3,632	3,438
46	trans-4-methoxythujane	3,877	3,897	3,853	3,830	3,830	3,857	3,859	3,831	3,798	3,830
47	octen-1-ol, acetate	-	0,418	0,437	0,434	0,434	-	0,438	0,434	0,431	0,434
48	Hexyl butyrate	0,582	0,553	0,578	0,575	0,575	0,579	0,579	0,575	0,570	0,575
49	Damascenine	2,390	2,403	2,375	2,361	2,361	2,378	2,379	2,362	2,341	2,361
50	n-tetradecane	2,736	2,751	2,719	2,703	2,703	2,722	2,723	2,704	2,680	2,703
51	2,6-octadien-1-ol,-3,7- dimethyl, acetate, (Z)	0,378	0,359	0,375	0,373	0,373	0,376	0,376	0,373	0,370	0,373
52	Myristicin	3,068	3,084	3,048	3,030	3,030	3,052	3,053	3,031	3,005	3,031
53	Calacorene	-	0,298	0,311	0,309	0,309	0,312	0,312	0,310	0,307	0,309
54	n-octyl isobutyrate	1,147	1,153	1,140	1,133	1,133	1,141	1,141	1,133	1,124	1,133
55	Calamine	0,277	-	0,275	0,274	0,274	0,276	-	0,274	0,271	0,274
56	2,6,6,9-tetramethyl tricycle [5.4.0.0(2,8)] undec-9-ene	1,569	1,577	1,559	1,550	1,550	1,561	1,561	1,550	1,537	1,550
57	β-elemene	0,449	0,427	0,446	0,444	0,444	0,447	0,447	0,444	0,440	0,444
58	Germacrene D	0,355	0,337	0,353	0,351	0,351	0,353	0,353	0,351	0,348	0,350
59	Longifolene	3,477	3,495	3,455	3,435	3,435	3,459	3,460	3,436	3,406	3,435
60	Aromadendrene	2,339	2,351	2,324	2,310	2,310	2,329	2,328	2,311	2,291	2,310
61	decahydro-4,8,8-trimethyl-9-methylene-1,4-methanoazulene	1,865	1,875	1,854	1,842	1,842	1,856	1,856	1,843	1,827	1,842
62	α-selinene	0,454	0,431	0,451	0,448	0,448	0,452	0,452	0,449	0,445	0,448
63	t-murolol	0,287	0,278	-	0,284	0,284	0,286	0,286	0,284	0,282	0,284
64	di-epi-α-cedrene	0,450	0,427	0,447	0,444	0,444	0,447	0,447	0,444	0,440	0,444
65	spiro[5.5]undec-2-ene,3,7,7-trimethyl-11-methylene, (-)	0,276	-	0,275	0,273	0,273	0,275	0,275	0,273	0,271	0,273
66	α-copaene	1,534	1,542	1,525	1,516	1,516	1,527	1,527	1,516	1,503	1,516
67	α-longicyclene	2,106	2,117	2,093	2,080	2,080	2,095	2,096	2,081	2,063	2,080
68	α-longipinene	1,517	1,525	1,507	1,500	1,500	1,509	1,509	1,499	1,486	1,498
69	Apiol	1,937	1,948	1,925	1,914	1,914	1,928	1,928	1,914	1,898	1,914
70	n-hexadecane	1,200	1,206	1,192	1,185	1,185	1,194	1,194	1,186	1,175	1,185
71	α-cadinol	0,291	0,277	0,289	0,288	0,288	0,290	0,290	0,288	0,285	0,287
72	1,5-dimethyl 1 vinyl 4 hexenyl butyrate	-	0,458	0,479	0,476	0,476	0,480	0,480	0,476	0,472	0,476
73	pimara-8(14),15-diene	0,857	0,862	0,852	0,847	0,847	0,853	0,853	0,847	0,840	0,847
74	Dithymoquinone	3,407	3,424	3,385	3,365	3,365	3,389	3,390	3,366	3,504	3,365

Keterangan: (*): komponen senyawa utama

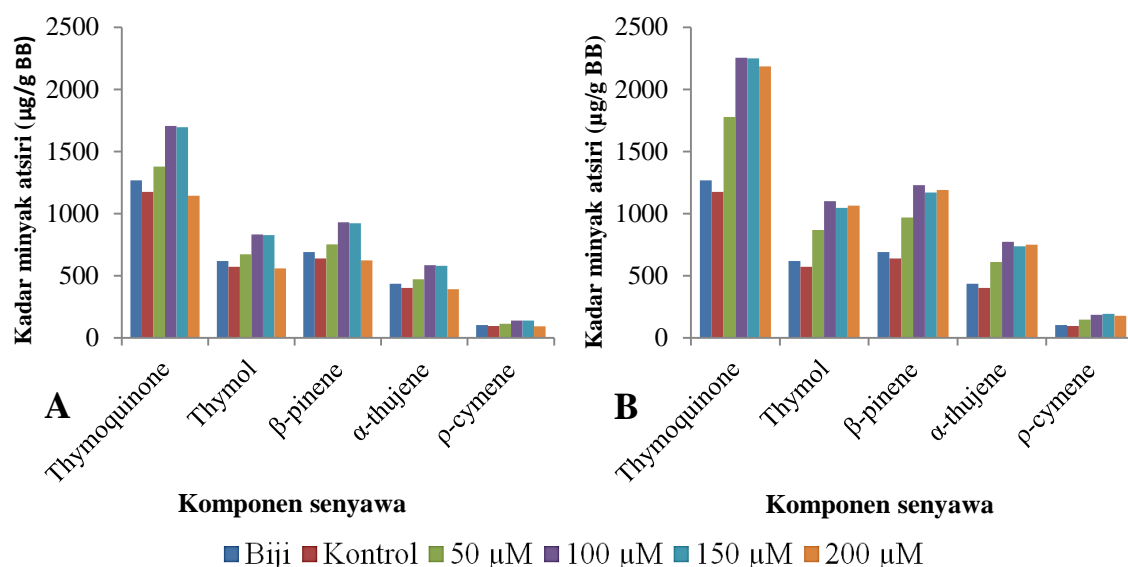
Komponen utama senyawa minyak atsiri jintan hitam pada kultur suspensi sel hasil perlakuan elisitasi menunjukkan kelimpahan yang berbeda-beda (Gambar 18). Kelimpahan senyawa utama pada biji dan kultur suspensi sel kontrol adalah *Thymoquinone* (4,700% dan 4,727%), *thymol* (3,194% dan 3,213%), *β-pinene* (3,265% dan 3,283%), *α-thujene* (2,145% dan 2,157%) dan *p-cymene* (0,535% dan 0,538%). Secara umum kelimpahan senyawa utama pada kultur suspensi sel kontrol lebih tinggi dibandingkan dengan pada biji. Kelimpahan senyawa utama pada kultur suspensi sel perlakuan elisitor SA adalah *Thymoquinone* (4,676%-4,643%), *thymol* (3,178%-3,155%), *β-pinene* (3,248%-3,225%), *α-thujene* (2,134%-2,118%) dan *p-cymene* (0,528%-0,532%). Kelimpahan senyawa utama pada perlakuan MJ adalah *Thymoquinone* (4,827%-4,643%), *thymol* (3,179%-3,129%), *β-pinene* (3,249%-3,198%), *α-thujene* (2,134%-2,101%) dan *p-cymene* (0,528%-0,579%). Kultur suspensi sel hasil perlakuan elisitor MJ 150 µM menunjukkan hasil kelimpahan senyawa *thymoquinone* dan *p-cymene* meningkat dibandingkan dengan kultur suspensi sel tanpa elisitasi dan pada biji.



Gambar 18. Kelimpahan komponen utama minyak atsiri pada kultur suspensi sel jintan hitam hasil perlakuan elisitasi
Keterangan: (A) elisitor asam salisilat (B) elisitor metil jasmonat

Kadar senyawa utama minyak jintan hitam pada biji lebih tinggi dibandingkan dengan kadar senyawa utama pada kultur suspensi sel tanpa elisitor. Peningkatan kadar senyawa utama minyak jintan hitam pada kultur suspensi sel mulai terjadi pada pemberian elisitor SA dan MJ pada konsentrasi 50 µM dan peningkatan mencapai optimum pada elisitasi dengan SA dan MJ pada konsentrasi 100-150 µM. Pada konsentrasi elisitor 200 µM, peningkatan kadar senyawa pada kultur suspensi mulai menurun.

Peningkatan kadar senyawa utama minyak jintan hitam pada kultur suspensi hasil elisitasi dengan MJ lebih tinggi dibandingkan dengan SA (Gambar 19).

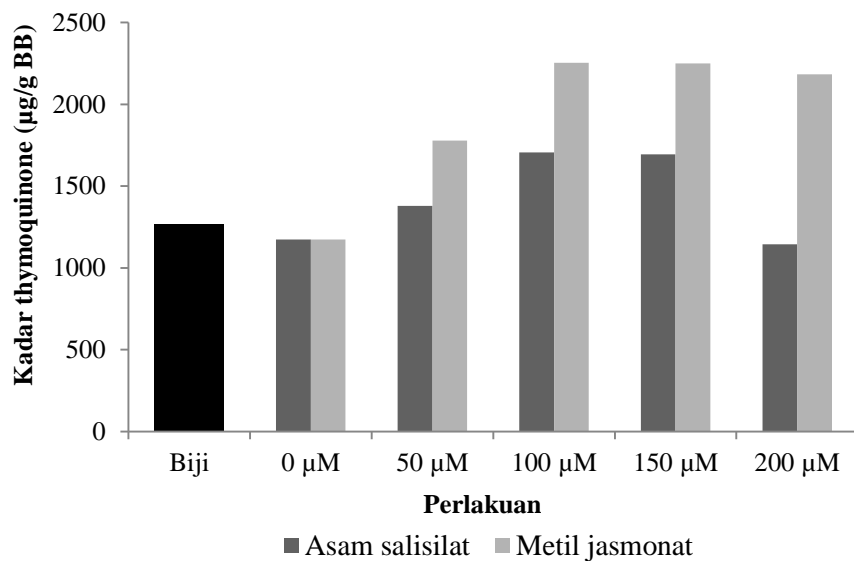


Gambar 19. Kadar komponen utama minyak atsiri pada kultur suspensi jintan hitam hasil perlakuan elisitasi
Keterangan; (A) elisitor asam salisilat (B) elisitor metil jasmonat

Elisitasi pada kultur suspensi sel dengan elisitor SA dan MJ dengan konsentrasi 50-200 µM meningkatkan kadar senyawa utama minyak atsiri jintan hitam. Kadar senyawa utama berupa *thymoquinone* pada biji dan kultur suspensi sel tanpa elisitasi adalah 1266,614 µg/g BB dan 1173,799 µg/g BB, sedangkan pada kultur suspensi sel hasil elisitasi dengan SA berkisar 1378,281 µg/g BB - 1143,288 µg/g BB dan elisitasi dengan MJ berkisar 1173,799 µg/g BB - 2184,320 µg/g BB. Kadar *thymol* pada biji dan kultur suspensi sel tanpa elisitasi adalah 617,387 µg/g BB dan 572,128 µg/g BB, sedangkan pada kultur suspensi sel hasil elisitasi dengan SA berkisar 671,837 µg/g BB - 557,261 µg/g BB dan elisitasi dengan MJ berkisar 866,654 µg/g BB - 1064,822 µg/g BB. Kadar senyawa *β-pinene* pada biji dan kultur suspensi sel tanpa elisitasi adalah 689,975 µg/g BB dan 639,390 µg/g BB, sedangkan pada kultur suspensi sel hasil elisitasi dengan SA berkisar 750,834 µg/g BB - 622,775 µg/g BB dan elisitasi dengan MJ berkisar 968,574 µg/g BB - 1190,056 µg/g BB.

Kadar senyawa *α-thujene* pada biji dan kultur suspensi sel tanpa elisitasi adalah 433,848 µg/g BB dan 402,029 µg/g BB, sedangkan pada kultur suspensi sel hasil elisitasi dengan SA berkisar 472,129 µg/g BB - 391,584 µg/g BB dan elisitasi dengan MJ berkisar 609,076 µg/g BB - 748,372 µg/g BB. Kadar senyawa *p-cymene* pada biji dan kultur suspensi sel tanpa elisitasi adalah 103,303 µg/g BB dan 95,710 µg/g BB, sedangkan pada

kultur suspensi sel hasil elisitasi dengan SA berkisar 112,438 $\mu\text{g/g BB}$ - 93,227 $\mu\text{g/g BB}$ dan elisitasi dengan MJ berkisar 145,096 $\mu\text{g/g BB}$ - 178,307 $\mu\text{g/g BB}$.



Gambar 20. Perbandingan kadar *thymoquinone* pada biji jintan hitam, kultur suspensi sel (kontrol) dan kultur suspensi sel hasil elisitasi dengan SA dan MJ

Elisitasi pada kultur suspensi sel dengan MJ 100-150 μM mampu meningkatkan senyawa minyak atsiri *thymoquinone*, *thymol*, β -pinene, α -thujene dan *p*-cymene sekitar 1,919 - 1,916 kali dibandingkan dengan kultur suspensi tanpa elisitasi, sedangkan elisitasi pada kultur suspensi dengan elisitor SA 100-150 μM mampu meningkatkan senyawa minyak *thymoquinone*, *thymol*, β -pinene, α -thujene dan *p*-cymene sekitar 1,452 - 1,442 kali dibandingkan dengan kultur suspensi tanpa elisitasi.

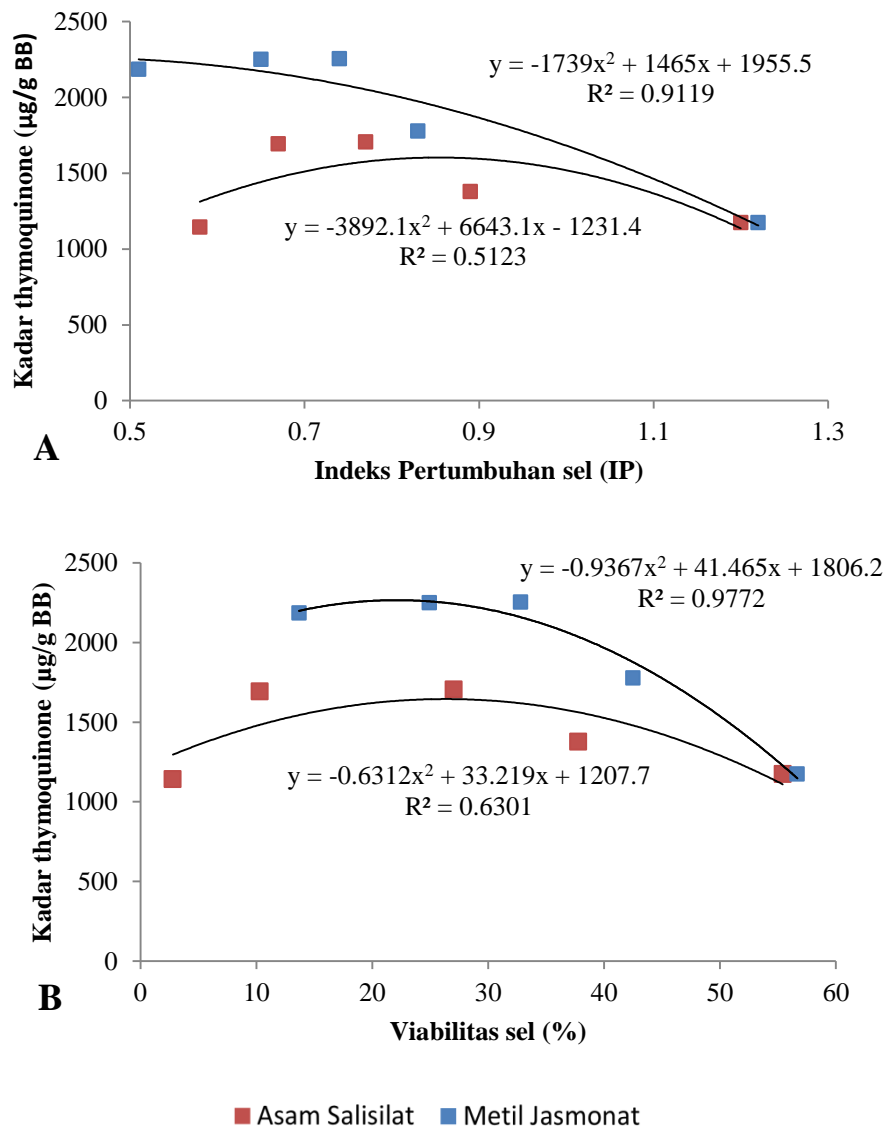
Kadar senyawa *thymoquinone* pada kultur suspensi sel sedikit lebih rendah dibandingkan dengan pada biji. Kadar senyawa *thymoquinone* pada kultur suspensi sel adalah 1173,799 $\mu\text{g/g BB}$ sedangkan pada biji 1266,614 $\mu\text{g/g BB}$. Namun demikian, elisitasi kultur suspensi sel dengan elisitor SA dan MJ mampu meningkatkan kadar senyawa *thymoquinone* lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol dan biji (Gambar 20). Kadar *thymoquinone* pada kultur suspensi hasil elisitasi dengan SA (50-200 μM) sebesar 1378,281 $\mu\text{g/g BB}$ - 1143,288 $\mu\text{g/g BB}$ dan hasil elisitasi dengan MJ (50-200 μM) sebesar 1173,799 $\mu\text{g/g BB}$ - 2184,320 $\mu\text{g/g BB}$. Peningkatan kadar *thymoquinone* pada kultur suspensi hasil elisitasi dengan MJ lebih tinggi dibandingkan dengan SA.

Kadar *thymoquinone* pada kultur suspensi sel mulai meningkat pada elisitasi dengan SA dan MJ pada konsentrasi 50 μM dan mencapai optimum pada konsentrasi 100-150 μM . Kadar senyawa *thymoquinone* pada kultur suspensi sel hasil elisitasi dengan MJ

100-150 μM adalah 2251,280 $\mu\text{g/g}$ BB meningkat 1,779 kali lipat dibandingkan dengan biji dan 1,917 kali lipat dibandingkan dengan kultur suspensi sel tanpa elisitasi. Kadar senyawa thomkuinone pada kultur suspensi sel hasil elisitasi dengan SA 100-150 μM adalah 1699,518 $\mu\text{g/g}$ BB meningkat 1,346 kali lipat dibandingkan dengan biji dan 1,448 kali lipat dibandingkan dengan kultur suspensi sel tanpa elisitasi. Pada konsentrasi elisitor 200 μM , kadar *thymoquinone* pada kultur suspensi mulai menurun.

Hasil uji regresi antara indeks pertumbuhan (IP) dengan kadar *thymoquinone* dan viabilitas sel (VS) dengan kadar *thymoquinone* menunjukkan adanya korelasi yang tinggi antara IP/VS dengan kadar *thymoquinone* pada kultur suspensi sel hasil elisitasi SA dan MJ dengan nilai determinasi di atas 0,5 (0,51-0,97) (Gambar 21). Hal ini menunjukkan adanya kontribusi dari IP dan VS pada kultur suspensi sel terhadap kadar *thymoquinone*. Korelasi antara IP dan VS dengan kadar *thymoquinone* pada kultur suspensi sel hasil elisitasi dengan SA dan MJ mempunyai pola yang sama. Kadar *thymoquinone* mulai meningkat pada pertumbuhan kultur suspensi sel (IP dan VS) dari rendah ke sedang dan kadar *thymoquinone* menurun pada pertumbuhan kultur suspensi sel tinggi.

Korelasi pertumbuhan kultur suspensi sel (IP dan VS) hasil elisitasi dengan MJ dengan kadar *thymoquinone* menghasilkan koefisien determinasi/R square ($R^2=0,91186$ dan $0,97716$) lebih tinggi dibandingkan hasil elisitasi dengan SA ($R^2= 0,51227$ dan $0,63009$). Nilai tersebut berarti pertumbuhan kultur suspensi sel hasil elisitasi dengan MJ memberikan pengaruh sebesar 94,45 % (rata2) terhadap kadar senyawa *thymoquinone*, sedangkan pertumbuhan kultur sel hasil elisitasi dengan SA memberikan pengaruh sebesar 57,118 % (rata2) terhadap kadar *thymoquinone*. Korelasi viabilitas sel pada kultur suspensi sel hasil elisitasi dengan kadar *thymoquinone* menghasilkan koefisien determinasi/R square ($R^2= 0,97716$ dan $0,63009$) lebih tinggi dibandingkan dengan indeks pertumbuhan ($R^2= 0,91186$ dan $0,51227$). Nilai tersebut menunjukkan viabilitas sel pada kultur suspensi sel memberikan pengaruh sebesar 80,363 % (rata2) terhadap kadar senyawa *thymoquinone*, sedangkan indeks pertumbuhan kultur suspensi sel memberikan pengaruh sebesar 71,207 % (rata2) terhadap kadar *thymoquinone*.



Gambar 21. Grafik korelasi antara indeks pertumbuhan dan viabilitas sel dengan kadar senyawa *thymoquinone* pada kultur suspensi jintan hitam perlakuan SA dan MJ. Keterangan: (A) korelasi IP dengan kadar *thymoquinone* (B) korelasi viabilitas sel dengan kadar *thymoquinone*

Konsentrasi elisitor yang semakin tinggi pada kultur suspensi sel dapat meningkatkan respon fisiologi berupa respon hipersensitif dan respon pertahanan pada sel. Elisitor yang bertindak sebagai molekul sinyal bagi pertahanan tanaman terhadap patogen maupun herbivora, secara fisiologi dapat menginduksi peningkatan metabolit sekunder sebagai senyawa pertahanan. Elisitor juga dapat mempengaruhi sistem pertahanan tanaman secara sistemik dengan menginduksi kematian sel terprogram (respon hipersensitif) sehingga menekan pertumbuhan sel dalam kultur suspensi sel. Hal ini menyebabkan

semakin rendah pertumbuhan sel (IP/VS) maka semakin tinggi produksi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan.

Peningkatan kandungan metabolit sekunder pada kultur suspensi sel dengan penambahan SA juga telah dilaporkan sebelumnya. Penambahan SA 100 μ M selama 4 hari pada kultur suspensi sel *Hypericum perforatum* L. dapat meningkatkan kandungan hypericin dan pseudohypericin masing-masing sebanyak 2,5 kali lipat dan 2,3 kali lipat dari kontrol (Gadzovska dkk., 2012). Hal ini didukung oleh penelitian Teixeira dkk. (2019) dengan penambahan SA 100 μ M pada kultur kalus *Garcinia brasiliensis* Mart. mampu meningkatkan total fenol hingga 5,34 kali dan flavonoid meningkat hingga 2,28 kali dari kontrol. Pada kultur suspensi sel *Jatropha curcas* dengan penambahan SA 200 μ M selama 15 hari dapat meningkatkan kadar *fatty acid* dan senyawa golongan alkana masing-masing sebanyak 5,6 kali lipat dan 2,14 kali lipat dari kontrol (Mahalakshmi dkk., 2013).

Kultur akar rambut atau *hairy-root* tanaman *Lactuca indica* L. menunjukkan peningkatan metabolit sekunder dengan perlakuan elisitor MJ. Penambahan MJ 100 μ M pada media dapat meningkatkan kandungan senyawa Flavonoid hingga 3,38 kali lipat dan *Total phenolic compound* meningkat hingga 2,15 kali lipat dari kontrol (Yi dkk., 2019). Pengaruh elisitor MJ pada kultur suspensi sel *Hypericum perforatum* dapat meningkatkan kandungan flavonoid sebesar 2,7 kali dibandingkan dengan kultur suspensi sel kontrol (Wang dkk., 2015). Akhgari dkk. (2019) menyatakan pada kultur *hairy-root* tanaman *Rhazya stricta* pada media cair dengan penambahan MJ 50 μ M sudah dapat meningkatkan Eburenine 3 kali lipat lebih tinggi, Quebrachamine tertinggi 2,5 kali lipat, Pleiocarpamin 1,7 kali lipat dan Tetrahydroalstonine 1,2 kali lipat dibandingkan dengan kontrol.

Elisitor MJ meningkatkan kandungan polifenol sebesar 52% dibandingkan kontrol (Gabotti dkk., 2019). Peningkatan kandungan senyawa metabolit sekunder pada perlakuan elisitor MJ lebih baik dibandingkan dengan elisitor SA juga telah dilaporkan oleh penelitian sebelumnya. Penambahan MJ 100 μ M dapat meningkatkan kandungan senyawa stilbene 2 kali lipat lebih tinggi dibandingkan kultur suspensi sel kontrol dan kultur suspensi sel perlakuan SA (Xu dkk., 2015). Pada kultur kalus *Celastrus paniculatus* dengan perlakuan SA dan MJ dapat meningkatkan senyawa metabolit sekunder triterpen. Elisitor MJ konsentrasi 50 μ M mampu meningkatkan kadar senyawa triterpen Ursolic acid meningkat hingga 5,6 kali lipat dan Oleanolic acid meningkat hingga 4,7 kali lipat dibandingkan kontrol (Martínez dkk., 2017).

Pemberian elisitor SA dan MJ dapat meningkatkan senyawa utama minyak jintan hitam dari golongan terpenoid (senyawa volatile) hal ini didasari oleh kejadian alamiahnya

seperti mekanisme tanaman ketika dimakan oleh herbivora atau terjadi luka secara mekanis lainnya, tanaman dapat melepaskan senyawa yang mudah menguap yakni senyawa volatil dari golongan terpenoid. Senyawa volatil yang dilepaskan dari bagian tanaman yang rusak menguap dan menyebabkan respons pertahanan pada jaringan tetangga atau pada tanaman lain (Balusamy dkk., 2015). Terpenoid (monoterpen dan sesquiterpen) adalah kelompok terbesar metabolit sekunder tanaman dan memainkan peran penting dalam pertahanan tumbuhan dari parasit, mikroba, cekaman, pertahanan terhadap luka dan sebagai interaksi *plant-herbivore*, tanaman-tanaman, dan lingkungan-tanaman (Aharoni dkk., 2003; Block dkk., 2019).

Elisitor JA dapat menginduksi *Localized Acquired Resistance* (LAR) pada tanaman. Mekanisme ini terjadi ketika ada serangan patogen, JA membantu kematian jaringan yang terpapar patogen tersebut sehingga mencegah serangan patogen menyebar lebih lanjut ke jaringan lain. Asam jasmonat mengaktifkan protein MYC2 (myelocytomatosis-2) sebuah faktor transkripsi yang melepaskan PR3, PR4, dan PDF 1.2 (Protodermal faktor 2) yang menyebabkan terjadinya system LAR (Gowthami, 2018). Perlakuan elisitor MJ pada tanaman juga dapat mempengaruhi gen jalur JA, seperti gen lipoksigenase (LOX), hidrogen peroksidase lyase (HPL), alen oksida sintase (AOS), dan alena oksida siklase (AOC1), dan gen jalur terpen, seperti isopentenil difosfat isomerase (IPP isomerase) yang meningkatkan produksi IPP dari mevalonat dan selanjutnya menjadi GPP. Senyawa GPP adalah prekursor monoterpen dan farnesyl difosfat sintase (FPPS), diekspresikan dengan tinggi dan menghasilkan akumulasi monoterpen dan seskuiterpen pada sel. Hasil ini menunjukkan bahwa perlakuan MJ eksogen dapat meningkatkan pemulihan dari efek luka dengan berfungsi sebagai sinyal jarak jauh. Selain itu, hasil ini menunjukkan bahwa MJ eksogen yang diberikan pada saat luka mekanis mencegah nekrosis pada daun ginseng dengan meningkatkan produksi terpenoid (Balusamy dkk., 2015).

Senyawa terpen adalah sekelompok senyawa volatil yang ada di tingkat basal pada tanaman yang tidak rusak. Akumulasi senyawa terpen meningkat sebagai respons terhadap berbagai tekanan biotik dan abiotik. Secara khusus, JA bertindak sebagai molekul transduksi sinyal perantara dan meningkatkan produksi senyawa volatil pada tanaman (Cheng dkk., 2007). Metil jasmonat adalah faktor kunci dalam memodulasi gen produksi senyawa terpen dan dapat mengakumulasi terpen yang lebih tinggi (Balusamy dkk., 2015). Penambahan asam jasmonat dapat menginisiasi transkripsi gen-gen yang terlibat dalam mekanisme pertahanan pada tumbuhan. Hasil akhir dari proses ini adalah peningkatan produksi senyawa-senyawa metabolit sekunder terutama senyawa yang terlibat dalam

mekanisme pertahanan pada tumbuhan (Habibah, 2009). Asam jasmonat dan metil jasmonat telah dibuktikan sebagai sinyal intraseluler yang dimulai dengan interaksi molekul elisitor dengan permukaan sel tumbuhan dan pada akhirnya menghasilkan akumulasi senyawa metabolit sekunder (Ram, dkk., 2013).

Senyawa SA dikenal molekul pensinyalan alami yang memainkan peran kunci dalam membangun dan menandakan respons pertahanan terhadap berbagai infeksi patogen dan juga menginduksi resistensi sistemik / *Systemic Acquired Resistance* (SAR) pada tanaman. Induksi SAR, setelah infeksi lokal, memerlukan semacam mediator komunikasi jarak jauh. Asam salisilat yang disintesis dalam sel dapat bergerak secara bebas masuk dan keluar dari sel, jaringan dan organ tanaman (Hayat dkk., 2010). Hal ini juga didukung oleh pernyataan Alvarez (2000) bahwa SA pada tanaman adalah senyawa aktivasi resistensi penyakit yang sering dikaitkan dengan jenis khusus kematian sel dalam respon hipersensitif (HR). Respon lokal ini sering dikaitkan dengan pembentukan SAR yang mengimunitasi seluruh tanaman terhadap infeksi lebih lanjut yang biasanya menyebabkan penyakit. Asam salisilat digunakan untuk mengurangi stres dan menghasilkan pengurangan sementara aktivitas katalase (CAT) dan peningkatan kadar H_2O_2 memainkan peran kunci dalam menyediakan SAR (Janda dkk., 2003; Chen dkk., 1993) dan toleransi terhadap stres oksidatif (Hayat dkk., 2010).

Sistem SAR adalah mekanisme pertahanan terinduksi yang memberikan perlindungan jangka panjang yang berpotensi terhadap jenis patogen/mikroorganisme yang luas dan ditemukan di berbagai spesies tanaman. Asam salisilat adalah senyawa sinyal kunci dalam respon SAR terhadap infeksi patogen. Setelah pengenalan patogen oleh inang, respons awal diinduksi termasuk fluks ion, fosforilasi, yang mendahului akumulasi ROS, oksida nitrat, SA, dan aktivasi transkripsi gen terkait pertahanan (Gowthami, 2018). Elisitor SA yang diberikan pada kultur suspensi sel menyebabkan kematian sel yang cukup signifikan pada konsentrasi tinggi, hal ini diikuti dengan kandungan minyak atsiri pada kultur suspensi sel jantan hitam pada perlakuan elisitor SA dengan konsentrasi tinggi menyebabkan penurunan kadar minyak atsiri hingga lebih rendah dari kontrol. Hal ini juga disebutkan oleh penelitian kultur kalus *Jatropha curcas*.

Pengaruh pemberian elisitor SA menyebabkan terjadinya proses pencoklatan (*browning*) pada sel *Jatropha curcas*, diikuti dengan konsentrasi senyawa terpenoid dengan jumlah gugus C lebih dari 40 yaitu karotenoid pada sel yang terus menurun (He dkk., 2009). Perlakuan elisitor SA dengan konsentrasi tinggi dapat menurunkan kandungan senyawa metabolit sekunder golongan naphthodianthrones turunan antrakuinon (hypericin

and pseudohypericin) pada kultur tunas *Hypericum hirsutum*, penurunan kandungan metabolit sekunder ditunjukkan pada perlakuan elisitor SA konsentrasi 100-200 μM selama 3 minggu perlakuan (Coste dkk., 2011).

Secara umum mekanisme induksi elisitor umumnya dianggap sebagai menginduksi ekspresi gen yang berhubungan dengan pertahanan dan mengaktifkan jalur metabolisme sekunder yang berhubungan dengan pertahanan (Qian dkk., 2006). Oleh karena itu, JA dan SA memiliki efek yang berbeda pada produksi senyawa sekunder, karena elisitor ini beroperasi di jalur pensinyalan tanaman yang berbeda dan merespon secara berbeda terhadap tekanan abiotik dan biotik (Namdeo, 2007). Ketika elisitor berikatan dengan reseptor, jalur transduksi sinyal dari dinding sel menuju sitosol diaktifkan dan menghasilkan produksi gen pertahanan. Gen pertahanan ini melepaskan beberapa produk gen yaitu, metabolit sekunder (tekanan abiotik), protein terkait patogenesis (PR), fitoaleksin, dan kitinase (tekanan biotik) yang membantu dalam respon imun primer tanaman (Gowthami, 2018). Menurut Yang dkk. (2019) jalur biosintesis asam salisilat dengan asam jasmonat bersifat antagonis, MPK4 secara positif mengatur GRX480 di jalur pensinyalan asam salisilat dan secara negatif mengatur MYC2 di jalur pensinyalan asam jasmonat, yang diperlukan untuk gen responsif asam jasmonat terhadap cekaman dengan mengaktifkan sistem pertahanan melalui PDF1.2 dan THI2.1.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Konsentrasi kinetin (0,5 - 3 mg/L) dengan kombinasi NAA 1 mg/L dapat mempengaruhi pembentukan kalus jantan hitam. Semakin tinggi konsentrasi kinetin yang diberikan maka semakin tinggi persentase pembentukan kalus.
2. Elisitasi SA dan MJ dapat menghambat pertumbuhan kultur suspensi sel. Semakin tinggi konsentrasi elisitor semakin menekan pertumbuhan kultur suspensi sel (SCV, PCV, berat basah dan berat kering, indeks pertumbuhan dan viabilitas sel). Jenis elisitor tidak berpengaruh secara signifikan terhadap pertumbuhan kultur sel tetapi berpengaruh terhadap viabilitas sel. Viabilitas sel pada perlakuan SA lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan MJ.
3. Elisitor SA dan MJ berpengaruh terhadap profil komponen dan kadar senyawa utama minyak jantan hitam. Komponen minyak jantan hitam pada biji teridentifikasi 71 senyawa, sedangkan pada kultur sel 70 komponen dan pada kultur sel hasil elisitasi teridentifikasi 71-74 senyawa. Senyawa utama minyak jantan hitam *thymoquinone*, *p-cymene*, *α -thujene*, *β -pinene* dan *thymol* teridentifikasi pada biji, kultur sel dan kultur sel hasil elisitasi. Elisitasi dengan SA dan MJ dengan konsentrasi 50-200 μ M pada kultur suspensi sel dapat meningkatkan kadar senyawa *thymoquinone* dan 4 senyawa utama minyak jantan hitam yang lain jauh lebih tinggi dibandingkan dengan pada biji. Elisitasi dengan MJ meningkatkan kadar senyawa utama minyak jantan hitam lebih tinggi dibandingkan SA. Metil jasmonat dan asam salisilat 100 μ M mampu meningkatkan kadar senyawa utama jantan hitam sebesar 1,78 kali lipat dan 1,35 kali lipat dibandingkan dari biji.

5.2 Saran

Teknik kultur suspensi sel jantan hitam dengan strategi elisitasi menggunakan SA dan MJ dapat meningkatkan minyak atsiri jantan hitam lebih tinggi dibandingkan dari biji. Oleh karena itu pada penelitian selanjutnya perlu dikembangkan sistem bioreaktor pada kultur suspensi sel jantan hitam sebagai upaya untuk produksi minyak jantan hitam skala besar.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboul-Ela EI. 2002. Cytogenetic Studies on *Nigella sativa* Seeds Extract and Thymoquinone on Mouse Cells Infected with Schistosomiasis using Karyotyping. *Mutat Res.* 516(1–2):11–17
- Afkar R, Sitepu FET, Hasanah Y. 2019. Respons Pertumbuhan dan Produksi Kedelai Varietas Wilis (*Glycine max* (L.) Merrill.) Terhadap Aplikasi Asam Salisilat dan Kitosan. *Petrop.* 6(1):153–159
- Agusta A. 2000. *Minyak atsiri tumbuhan tropika Indonesia*. Bandung: Penerbit ITB.
- Aharoni A, Giri AP, Deuerlein S, Griepink F, de Kogel W-J, Verstappen FWA, Verhoeven HA, Jongsma MA, Schwab W, Bouwmeester HJ. 2003. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell.* 15(12):2866–2884
- Ahmed ABA, Pallela R, Rao AS, Rao MV, Taha RM. 2011. Optimized conditions for callus induction, plant regeneration and alkaloids accumulation in stem and shoot tip explants of *Phyla nodiflora*. *Spanish Journal of Agricultural Research.* 9(4):1262–1270
- Akhgari A, Laakso I, Maaheimo H, Choi Y, Seppänen-Laakso T, Oksman-Caldentey K-M, Rischer H. 2019. Methyljasmonate Elicitation Increases Terpenoid Indole Alkaloid Accumulation in *Rhazya stricta* Hair Root Cultures. *Plants.* 8(12):534
- Alemi M, Sabouni F, Sanjarian F, Haghbeen K, Ansari S. 2013. Anti-inflammatory effect of seeds and callus of *Nigella sativa* L. extracts on mix glial cells with regard to their thymoquinone content. *AAPS PharmSciTech.* 14(1):160–167
- Al-Majed AA, Daba MH, Asiri YA, Al-Shabanah OA, Mostafa AA, El-Kashef HA. 2001. Thymoquinone-induced relaxation of guinea-pig isolated trachea. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 110(5–6):333–345.
- Al-Saleh IA, G B, El-Doush II. 2006. Levels of selenium, DL- α -tocopherol, DL- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds. *J Food Compost Anal.* 19(2–3):167–175
- Alvarez M. 2000. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant molecular biology.* 44:429–442
- Anusha, Joseph, Elyas K K. 2016. Callus Induction and Elicitation of Total Phenolics in Callus Cell Suspension Culture of *Celastrus paniculatus* – wild, an Endangered Medicinal Plant in India. *Pharmacognosy Journal.* 8:471–475
- Baday SJS. 2019. Plant Tissue Culture. *International Journal of Environmental Engineering.* 4(4):977–990.
- Balusamy SRD, Rahimi S, Sukweenadhi J, Kim Y-J, Yang D-C. 2015. Exogenous methyl jasmonate prevents necrosis caused by mechanical wounding and increases terpenoid biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 123(2):341–348.
- Bamosa AO, Ali BA, al-Hawsawi ZA. 2002. The effect of thymoquinone on blood lipids in rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* 46(2):195–201.
- Beigmohamadi M, Movafeghi A, Sharafi A, Jafari S, Danafar H. 2019. Cell Suspension Culture of *Plumbago europaea* L. Towards Production of Plumbagin. *Iran J Biotechnol.* 17(2):46–54
- Belgaumi UI, Patil S, Gandhi JM, Shete AS. 2020. The Many Therapeutic Applications of *Nigella sativa* - A Review of Literature. *jemds.* 9(30):2151–2157
- Bhoite HA, Palshikar GS. 2014. Plant Tissue Culture: A Review. *World Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2(6):565–572.
- Block AK, Vaughan MM, Schmelz EA, Christensen SA. 2019. Biosynthesis and function of terpenoid defense compounds in maize (*Zea mays*). *Planta.* 249(1):21–30

- Botnick I, Xue W, Bar E, Ibdah M, Schwartz A, Joel DM, Lev E, Fait A, Lewinsohn E. 2012. Distribution of Primary and Specialized Metabolites in *Nigella sativa* Seeds, a Spice with Vast Traditional and Historical Uses. *Molecules*. 17(9):10159–10177
- Bourgou S, Ksouri R, Bellila A, Skandrani I, Falleh H, Marzouk B. 2008. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies*. 331(1):48–55
- Bouwmeester HJ, Gershenzon J, Konings MCJM, Croteau R. 1998. Biosynthesis of the Monoterpenes Limonene and Carvone in the Fruit of Caraway: I. Demonstration of Enzyme Activities and Their Changes with Development. *Plant Physiology*. 117(3):901–912
- BPS. 2016. *Statistik Perdagangan Luar Negeri Indonesia Impor 2016 Jilid I*. Jakarta: Badan Pusat Statistik.
- Brodersen P, Malinovsky FG, Hématy K, Newman M-A, Mundy J. 2005. The Role of Salicylic Acid in the Induction of Cell Death in *Arabidopsis* *acd11*. *Plant Physiol*. 138(2):1037–1045
- Buitelaar RM, Casário MT, Tramper J. 1992. Elicitation of thiophene production by hairy roots of *Tagetes patula*. *Enzyme and Microbial Technology*. 14(1):2–7
- Burits M, Bucar F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*. 14(5):323–328
- Burke CC, Wildung MR, Croteau R. 1999. Geranyl diphosphate synthase: Cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(23):13062–13067.
- Chaieb K, Kouidhi B, Jrah H, Mahdouani K, Bakhrouf A. 2011. Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11(1):2–6
- Chaudhry H, Fatima N, Ahmad I. 2014a. Evaluation of *Nigella sativa* L. callus extracts under elicitation for phytochemical and antibacterial activity. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 5(4):903–916.
- Chaudhry H, Fatima N, Ahmad I. 2014b. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Nigella sativa* L. For thymol production. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(1):788–794.
- Chen Z, Silva H, Klessig DF. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*. 262(5141):1883–1886
- Cheng A-X, Xiang C-Y, Li J-X, Yang C-Q, Hu W-L, Wang L-J, Lou Y-G, Chen X-Y. 2007. The rice (E)-beta-caryophyllene synthase (OsTPS3) accounts for the major inducible volatile sesquiterpenes. *Phytochemistry*. 68(12):1632–1641
- Chodisetti B, Rao K, Gandi S, Giri A. 2015. Gymnemic acid enhancement in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre* by using the signaling molecules—methyl jasmonate and salicylic acid. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*. 51(1):88–92.
- Coste A, Vlase L, Halmagyi A, Deliu C, Coldea G. 2011. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 106(2):279–288
- Creelman RA, Tierney ML, Mullet JE. 1992. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(11):4938–4941.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. 2000. *Natural Products (Secondary Metabolites)*. American Society of Plant Physiologists.

- Darwati I. 2007. Kultur kalus dan kultur akar rambut purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) untuk menghasilkan metabolit sekunder [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Durner J, Shah J, Klessig DF. 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*. 2(7):266–274
- Efferth T. 2019. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*. 5(1):50–59
- El-Abhar HS, Abdallah DM, Saleh S. 2003. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *J Ethnopharmacol*. 84(2–3):251–258
- El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, Matsuyama H, El-Sayed M, Takewaki T. 2005. Successful Abrogation by Thymoquinone Against Induction of Diabetes Mellitus with Streptozotocin via Nitric Oxide Inhibitory Mechanism. *Int Immunopharmacol*. 5(1):195–207
- El-Saleh SC, Al-Sagair OA, Al-Khalaf MI. 2004. Thymoquinone and *Nigella sativa* oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats. *Int J Cardiol*. 93(1):19–23
- Fauzi A, Hameed I, Jawad M. 2017. A Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*. 9(1):81–85
- Forouhar F, Yang Y, Kumar D, Chen Y, Fridman E, Park SW, Chiang Y, Acton TB, Montelione GT, Pichersky E, dkk., 2005. Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *PNAS*. 102(5):1773–1778
- Gabotti D, Locatelli F, Cusano E, Baldoni E, Genga A, Pucci L, Consonni R, Mattana M. 2019. Cell Suspensions of *Cannabis sativa* (var. Futura): Effect of Elicitation on Metabolite Content and Antioxidant Activity. *Molecules*. 24(22):1–18
- Gadzovska S, Maury S, Delaunay A, Spasenoski M, Hagège D, Courtois D, Joseph C. 2012. The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphthodianthrone and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 113(1):25–39
- Gali-Muhtasib H, El-Najjar N, Schneider-Stock R. 2006. The medicinal potential of black seed (*Nigella sativa*) and its components. Di dalam: Khan MTH, Ather A, editor. *Advances in Phytomedicine*. Vol. 2. Elsevier. (Lead Molecules from Natural Products). hlm. 133–153.
- George EF, Hall MA, Klerk G-JD, editor. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background*. Ed ke-3 Volume ke-1. Springer Netherlands.
- Ghamarnia H, Khosravy H, Sepehri H. 2010. Yield and water use efficiency of (*Nigella sativa* L.) under different irrigation treatments in a semi arid region in the West of Iran. *Journal of medicinal plant research*. 4(16):1612–1616.
- Godoy-Hernández G, Vázquez-Flota FA. 2012. Growth measurements: estimation of cell division and cell expansion. *Methods Mol. Biol*. 877:41–48
- Gowthami L. 2018. Role of elicitors in plant defense mechanism. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7(6):2806–2812.
- Gutensohn M, Orlova I, Nguyen TTH, Davidovich-Rikanati R, Ferruzzi MG, Sitrit Y, Lewinsohn E, Pichersky E, Dudareva N. 2013. Cytosolic monoterpene biosynthesis is supported by plastid-generated geranyl diphosphate substrate in transgenic tomato fruits. *Plant J*. 75(3):351–363

- Habibah NA. 2009. Efektivitas Penambahan Elisitor Asam Jasmonik dalam Peningkatan Sintesis Senyawa Bioaktif Andrografolid pada Kultur Suspensi Sel Sambiloto. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*. 1(1):11–18
- Hadi, M. Yahya dan Hameed, I. Hadi . 2017. Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Chemical Compounds of *Lepidium Sativum*: A review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 10(11):4039–4042
- Harzallah HJ, Grayaa R, Kharoubi W, Maaloul A, Hammami M, Mahjoub T. 2012. Thymoquinone, the *Nigella sativa* bioactive compound, prevents circulatory oxidative stress caused by 1,2-dimethylhydrazine in erythrocyte during colon postinitiation carcinogenesis. *Oxid Med Cell Longev*. 2012(1):1–6
- Hawsawi ZA, Ali BA, Bamosa AO. 2001. Effect of *Nigella sativa* (Black Seed) and thymoquinone on blood glucose in albino rats. *Ann Saudi Med*. 21(3–4):242–244
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A. 2010. Effect of Exogenous Salicylic Acid under Changing Environment: A Review. *Environmental and Experimental Botany*. 68(1):14–25
- He Y, Guo X, Lu R, Niu B, Pasapula V, Hou P, Cai F, Xu Y, Chen F. 2009. Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 98(1):11–17
- Hosseinzadeh H, Jaafari MR, Khoei AR, Rahmani M. 2010. Anti-ischemic Effect of *Nigella sativa* L. Seed in Male Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 5(1):53–58
- Hussain A, Nadeem A, Ashraf I, Awan M. 2009. Effect of Weed Competition Periods on The Growth and Yield of Black Seed (*Nigella sativa* L.). *Pak. J. Weed Sci. Res*. 15(1):71–81
- Hutami S. 2016. TINJAUAN Penggunaan Suspensi Sel dalam Kultur In Vitro. *Jurnal AgroBiogen*. 5(2):84–92
- Janda T, Szalai G, Rios-Gonzalez K, Veisz O, Páldi E. 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science*. 164(2):301–306
- Kamińska M. 2021. Role and activity of jasmonates in plants under in vitro conditions. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2021:1–23
- Khalili M, Hasanloo T, Kazemi Tabar SK, Rahnema H. 2009. Influence of exogenous salicylic acid on flavonolignans and lipoxygenase activity in the hairy root cultures of *Silybum marianum*. *Cell Biology International*. 33(9):988–994
- Khan MA, Afzal M. 2016. Chemical composition of *Nigella sativa* Linn: Part 2 Recent advances. *Inflammopharmacology*. 24(2–3):67–79
- Khanpour-Ardestani N, Sharifi M, Behmanesh M. 2015. Establishment of callus and cell suspension culture of *Scrophularia striata* Boiss.: an in vitro approach for acteoside production. *Cytotechnology*. 67(3):475–485
- Kurniati R, Purwito A, Wattimena GA, Marwoto B, Supenti S. 2016. Induksi Kalus dan Bulblet serta Regenerasi Tanaman Lili Varietas Sorbon dari Tangkai Sari Bunga. *J.Hort*. 22(4):303–308
- Kuzuyama T, Seto H. 2003. Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat Prod Rep*. 20(2):171–183
- Li Y, Meng T, Wang Y, Zhang X. 2016. Study on enzymatic browning in suspension cultures of licorice cells. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 30(2):277–283
- Lila MA. 2004. Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach. *J. Biomed. Biotechnol*. 2004(5):306–313

- Lois LM, Campos N, Putra SR, Danielsen K, Rohmer M, Boronat A. 1998. Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(5):2105–2110
- Mahalakshmi R, Palanisami E, Parida A. 2013. Salicylic acid elicitation on production of secondary metabolite by cell cultures of *Jatropha curcas* L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(4):655–659.
- Mahgoub AA. 2003. Thymoquinone protects against experimental colitis in rats. *Toxicol Lett*. 143(2):133–143
- Mansour MA, Nagi MN, El-Khatib AS, Al-Bekairi AM. 2002. Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell Biochem Funct*. 20(2):143–151
- Mardisiwi RS. 2017. Pertumbuhan Tanaman dan Produksi Timokuinon Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) pada Beberapa Komposisi Media Tanam dan Interval Penyiraman [Thesis]. Bogor Agricultural University (IPB)
- Martínez VMV, Estrada-Soto SE, Arellano-García J de J, Rivera-Leyva JC, Castillo-España P, Flores AF, Cardoso-Taketa AT, Perea-Arango I. 2017. Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Enhanced the Production of Ursolic and Oleanolic Acid in Callus Cultures of *Lepechinia caulescens*. *Pharmacogn Mag*. 13(4):886–889
- Mendoza D, Cuaspué O, Arias JP, Ruiz O, Arias M. 2018. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology Reports*. 19(2018):1–19
- Meral I, Yener Z, Kahraman T, Mert N. 2001. Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally-induced diabetic rabbits. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 48(10):593–599
- Mohamed A, Shoker A, Bendjelloul F, Mare A, Alzrih M, Benghuzzi H, Desin T. 2003. Improvement of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by thymoquinone; an oxidative stress inhibitor. *Biomed Sci Instrum*. 39:440–445.
- Mustafa NR, Winter W de, Iren F van, Verpoorte R. 2011. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nat Protoc*. 6(6):715–742
- Namdeo A. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *undefined*. 1(1):69–79.
- Niederl S, Kirsch T, Riederer M, Schreiber L. 1998. Co-Permeability of 3H-Labeled Water and 14C-Labeled Organic Acids across Isolated Plant Cuticles: Investigating Cuticular Paths of Diffusion and Predicting Cuticular Transpiration. *Plant Physiology*. 116(1):117–123
- Norsharina I, Maznah I, Aied A-A, Ghanya A-N. 2011. Thymoquinone rich fraction from *Nigella sativa* and Thymoquinone are Cytotoxic Towards Colon and Leukemic carcinoma cell lines. *JMPR*. 5(15):3359–3366.
- Ohta H, Suzuki G, Awai K, Masuda T, Kato T, Shibata D, Takamiya K. 2006. Distinct pathways for jasmonate- and elicitor-induced expressions of a cytochrome P450 gene in soybean suspension-cultured cells. *Physiologia Plantarum*. 100(3):647–652
- Orbán N, Boldizsár I, Szűcs Z, Dános B. 2008. Influence of different elicitors on the synthesis of anthraquinone derivatives in *Rubia tinctorum* L. cell suspension cultures. *Dyes and Pigments*. 1(77):249–257

- Osman NI, Jaafar Sidik N, Awal A. 2016. Effects of variations in culture media and hormonal treatments upon callus induction potential in endosperm explant of *Barringtonia racemosa* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6(2):143–147
- Park S-W, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig D. 2007. Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance. *Science (New York, N.Y.)*. 318(5847):113–116
- Permanasari Y. 2015. Pengaruh asam salisilat dan fenilalanin terhadap kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel *Moringa oleifera* Lam. [Skripsi]. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember
- Qian Z-G, Zhao Z-J, Xu Y, Qian X, Zhong J-J. 2006. Novel Chemically Synthesized Salicylate Derivative as an Effective Elicitor for Inducing the Biosynthesis of Plant Secondary Metabolites. *Biotechnology Progress*. 22(1):331–333
- Ram, M. Prasad K, Singh Dr shiv, Hada B, Kumar S. 2013. Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of *Rosa hybrida* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 113(3):459–467
- Ramulifho E, Goche T, Van As J, Tsilo TJ, Chivasa S, Ngara R. 2019. Establishment and Characterization of Callus and Cell Suspension Cultures of Selected *Sorghum bicolor* (L.) Moench Varieties: A Resource for Gene Discovery in Plant Stress Biology. *Agronomy*. 9(5):218
- Sák M, Dokupilová I, Kaňuková Š, Mrkvová M, Mihálik D, Hauptvogel P, Kraic J. 2021. Biotic and Abiotic Elicitors of Stilbenes Production in *Vitis vinifera* L. Cell Culture. *Plants*. 10(3):490
- Sakhabutdinova AR, Fatkhutdinova DR, Shakirova FM. 2004. Effect of Salicylic Acid on the Activity of Antioxidant Enzymes in Wheat under Conditions of Salination. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 40(5):501–505
- Sansanelli S, Zanichelli D, Filippini A, Ferri M, Tassoni A. 2014. Production of free and glycosylated isoflavones in in vitro soybean (*Glycine max* L.) hypocotyl cell suspensions and comparison with industrial seed extracts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 119:301–311
- Sari PS. 2018. Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Tanaman Kina (*Cinchona ledgeriana* Moens) dalam Media Cair yang Dikocok dan Bioreaktor Beraerasi. [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sathyanarayana BN, Verghese DB. 2007. *Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols*. I. K. International Pvt Ltd. Ed ke-Google-Books-ID
- Seskar M, Shulaev V, Raskin I. 1998. Endogenous Methyl Salicylate in Pathogen-Inoculated Tobacco Plants. *Plant Physiology*. 116(1):387–392
- Setiawati E, Kurniawati A, Widodo WD, Faridah dan DN. 2018. Pertumbuhan Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) pada Tingkat Naungan dan Pemupukan Nitrogen yang Berbeda. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*. 46(2):202–207
- Shnaishel S. 2019. Plant Tissue Culture. *International Journal of Environmental Engineering*. 4(4):977–990.
- Sridhar TM, Naidu CV. 2011. An Efficient Callus Induction and Plant Regeneration of *Solanum nigrum* (L.) - An Important Antiulcer Medicinal Plant. *Journal of Phytology*. 3(5):23–28.
- Srinivasan K. 2018. Cumin (*Cuminum cyminum*) and black cumin (*Nigella sativa*) seeds: traditional uses, chemical constituents, and nutraceutical effects. *Food Quality and Safety*. 2(1):1–16

- Suryadi R. 2014. Karakter Morfologi dan Pemupukan N dan P Anorganik terhadap Pertumbuhan dan Produksi Bioaktif Thymoquinone Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.). [Tesis]. Bogor : Institut Pertanian Bogor
- Suryadi R. 2016. Perubahan Karakter Fisiologi dan Seyawa Sekunder Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) di Indonesia. *WartaBalitro*. 33(65):20.
- Teixeira MG, Carvalho M, Leite MA, Barbosa S, Santos filho PR dos, Santos BR. 2019. Effect of Salicylic Acid, 2,4-D and 2i-P on the Production of Secondary Metabolites in *Garcinia brasiliensis* Mart. Callus. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 62:1–11
- Tounekti T, Hernández I, Munné-Bosch S. 2013. Salicylic Acid Biosynthesis and Role in Modulating Terpenoid and Flavonoid Metabolism in Plant Responses to Abiotic Stress. hlm. pp 141-162.
- Tripathi D, Raikhy G, Kumar D. 2019. Chemical elicitors of systemic acquired resistance—Salicylic acid and its functional analogs. *Current Plant Biology*. 17(2019):48–59
- Tuncturk R, Tuncturk M, Vahdettin C. 2012. The Effects Of Varying Nitrogen Doses On Yield And Some Yield Components Of Black Cumin (*Nigella sativa* L.). *Advances in Environmental Biology*. 6(2):855–858.
- Van Loon LC. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*. 103(9):753–765
- Vanisree M, Lee C-Y, Lo S-F, Nalawade SM, Lin CY, Tsay H. 2004. Studies on the Production of Some Important Secondary Metabolites from Medicinal Plants by Plant Tissue Cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 45(1):1–22
- Vasconsuelo A, Boland R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*. 172(5):861–875
- Venkatachallam SKT, Pattekhan H, Divakar S, Kadimi US. 2010. Chemical composition of *Nigella sativa* L. seed extracts obtained by supercritical carbon dioxide. *J Food Sci Technol*. 47(6):598–605
- Walker TS, Pal Bais H, Vivanco JM. 2002. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry*. 60(3):289–293
- Wang J, Qian J, Yao L, Lu Y. 2015. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing*. 2(1):1–9
- Xu A, Zhan J-C, Huang W-D. 2015. Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 122(1):197–211
- Yang J, Duan G, Li C, Liu L, Han G, Zhang Y, Wang C. 2019. The Crosstalks Between Jasmonic Acid and Other Plant Hormone Signaling Highlight the Involvement of Jasmonic Acid as a Core Component in Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses. *Front. Plant Sci*. 10(1349):1–12
- Yi TG, Park Y, Park J-E, Park NI. 2019. Enhancement of Phenolic Compounds and Antioxidative Activities by the Combination of Culture Medium and Methyl Jasmonate Elicitation in Hairy Root Cultures of *Lactuca indica* L. *Natural Product Communications*. 14(7):1–9
- Yusuf MS. 2014. Efektivitas Penggunaan Jintan Hitam (*Nigella sativa*) dalam Proses Percepatan Penyembuhan Luka Setelah Pencabutan Gigi [Skripsi]. Makasar: Universitas Hasanuddin.

- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 23(4):283–333
- Zhao J, Zhu W-H, Hu Q. 2001. Enhanced Catharanthine Production in *Catharanthus roseus* Cell Cultures by Combined Elicitor Treatment in Shake Flasks and Bioreactors. *Enzyme Microb Technol.* 28(7–8):673–681
- Zhao J-L, Zhou L-G, Wu J-Y. 2010. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87(1):137–144
- Zulhilmi, Suwirman, Surya NW. 2012. Pertumbuhan dan Uji Kualitatif Kandungan Metabolit Sekunder Kalus Gatang (*Spilanthes acmella* Murr.) dengan Penambahan PEG untuk Menginduksi Cekaman Kekeringan. *Jurnal Biologi UNAND.* 1(1):1–8

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi dan Standar Penimbangan Stok Medium Dasar MS

LT. 1.1 Komposisi Media Dasar MS (Murhisage & Skoog)

Komponen Bahan Kimia	Jumlah (mg/L)
Makronutrien :	
KNO ₃	1.900
NH ₄ NO ₃	1.650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Mikronutrien :	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O (dilarutkan dengan Na ₂ EDTA 37,3 mg/l)	27,8
Vitamin :	
Thiamin-HCl	0,1
Nicotinic acid	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Glycin	2
Myo-inositol	100
Sukrosa	30.000

LT. 1.2. Pengambilan Stok Media Dasar MS (Murhisage & Skoog)

Larutan Stok	Bahan Kimia	Berat untuk 100 mL (gram)	Pengambilan larutan stok dalam 1 Liter media
A	NH ₄ NO ₃	8,25	20 mL
B	KNO ₃	9,50	20 mL
C	CaCl ₂ .H ₂ O	4,40	10 mL
D	MgSO ₄ .7H ₂ O	3,70	10 mL
	KH ₂ PO ₄	1,70	
E	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,56	5 mL
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,75	
F	H ₃ BO ₃	0,12	5 mL
	MnSO ₄ .4H ₂ O	0,34	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,17	
G	KI	0,20	0,5 mL
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,05	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,005	
Vitamin MS	Nicotinic acid	0,05	1 mL
	Pyridoxine-HCl	0,05	
	Thiamine-HCl	0,01	
	Glycine	0,20	
Myo-inositol	Myo-inositol	1,00	10 mL

Lampiran 2. Pembuatan dan Pengambilan Stok Elisitor

Lampiran 2.1 Perhitungan dan Pembuatan Stok SA 0,01M

Stok SA (Merck) : 10 gram
Mr SA : 138,12 g/mol
Molar yang dicari : 0,01M

$$(M) SA = \frac{Mol}{Volume} = 0,01M = \frac{massa\ zat}{Mr} \times \frac{1000}{mL}$$

$$0,01M = \frac{X}{138,12} \times \frac{1000}{10}$$

$$138,12 = 100X$$

$$X = \frac{138,12}{100}$$

$$X = \underline{0,013812 \text{ gram}}$$

- Pembuatan larutan stok SA 0,01M dengan cara menimbang Asam Salisilat (Merck) sebanyak 0,013812 gram dan dilarutkan dengan etanol P.A. 99,9% (Merck) sebanyak 10 mL. Stok SA yang telah homogen disaring menggunakan syringe filter dengan kerapatan pori 0,25µm, lalu larutan stok hasil penyaringan dimasukkan ke dalam botol kaca steril kemudian ditutup dengan plastik dan karet. Proses penyaringan larutan stok elisitor dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*) dan dilakukan di dekat api bunsen.

Lampiran 2.2 Perhitungan dan Pembuatan Stok MJ 0,01M

Volume MJ (Duchefa) : 1 mL
Kadar : 97 %
Mr MJ : 224,30 g/mol
Densitas : 1,028 g/mL
Molar yang dicari : 0,01M

$$\begin{aligned} \text{Massa MJ (m)} &= \text{Kadar} \times \text{Densitas} \times \text{Volume} \\ &= 97 \% \times 1,028 \text{ g/mL} \times 1 \text{ mL} \\ &= 0,99716 \text{ gram} \end{aligned}$$

$$(M) MJ = \frac{Mol}{Volume} = M = \frac{massa\ zat}{Mr} \times \frac{1000}{mL}$$

$$M = \frac{0,99716}{224,30} \times \frac{1000}{1}$$

$$M = \frac{997,16}{224,3}$$

$$M = 4,4457 \text{ mol/L}$$

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$4,4457 \cdot X = 0,01 \cdot 10$$

$$X = \frac{0,1}{4,4457}$$

$$X = 0,02249 \text{ mL}$$

$$= \underline{22,49 \mu\text{L}}$$

- Pembuatan larutan stok MJ 0,01M dengan cara mengambil Metil Jasmonat (Duchefa) sebanyak 22,49 µL dan dilarutkan menggunakan etanol P.A. 99,9% (Merck) hingga menjadi 10 mL. Larutan stok MJ dihomogenkan menggunakan vortex. Larutan stok MJ yang telah homogen selanjutnya disaring menggunakan syringe filter dengan kerapatan pori 0,25µm, lalu larutan stok hasil penyaringan dimasukkan ke dalam botol kaca steril kemudian ditutup dengan plastik dan karet. Proses penyaringan larutan stok elisitor dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*) dan dilakukan di dekat api bunsen.

Lampiran 2.3 Pengambilan Stok Elisitor SA dan MJ kedalam Media Perlakuan

Konsentrasi 50 μ M

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$0,01M \cdot X = 0,00005M \cdot 250mL$$

$$X = \frac{0,0125}{0,01}$$

$$X = \underline{1,25 \text{ mL}}$$

Konsentrasi 100 μ M

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$0,01M \cdot X = 0,0001M \cdot 250mL$$

$$X = \frac{0,025}{0,01}$$

$$X = \underline{2,5 \text{ mL}}$$

Konsentrasi 150 μ M

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$0,01M \cdot X = 0,00015M \cdot 250mL$$

$$X = \frac{0,0375}{0,01}$$

$$X = \underline{3,75 \text{ mL}}$$

Konsentrasi 200 μ M

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$0,01M \cdot X = 0,0002M \cdot 250mL$$

$$X = \frac{0,05}{0,01}$$

$$X = \underline{5 \text{ mL}}$$

- Penambahan larutan stok 0,01M elisitor SA dan MJ dilakukan setelah media disterilisasi menggunakan autoklaf dan didiamkan terlebih dahulu hingga suhu turun minimal 40°C. Penambahan elisitor sesuai dengan perhitungan diatas. Stok elisitor ditambahkan media cair hingga volume total 250mL, selanjutnya dibagi masing-masing 25mL/botol hingga diperoleh 10 ulangan setiap perlakuan. Media yang telah dituangkan ke dalam botol erlenmeyer 100mL kemudian ditutup dengan plastik dan karet. Proses ini dilakukan di dalam LAF (Laminar Air Flow) dan dilakukan di dekat api bunsen.

Lampiran 3. Data dan Analisis ANOVA Induksi Kalus Biji Jintan Hitam

LT 3.1 Data waktu muncul kalus, berat basah kalus, persentase eksplan hidup dan persentase eksplan tumbuh kalus Jintan Hitam

NAA (mg/L)	Kinetin (mg/L)	Waktu muncul kalus (hari)	Berat basah kalus (gram)	Persentase Eksplan hidup (%)	Persentase eksplan berkalus (%)
1	0	17.08±1.615	0.080±0.029	56±18.585	44±14.142
	0,5	16.19±2.605	0.080±0.018	60±13.082	56±11.353
	1	15.37±0.949	0.118±0.041	72±10.865	66±9.661
	2	12.23±1.974	0.172±0.023	84±8.433	84±8.433
	3	16.75±1.012	0.140±0.029	84±12.649	82±11.353

LT 3.2 Data analisis ANOVA waktu muncul kalus biji Jintan Hitam

ANOVA

Hari Tumbuh Kalus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	158.520	4	39.630	12.577	.000
Within Groups	141.800	45	3.151		
Total	300.320	49			

Hari Tumbuh Kalus

	Perlakuan ZPT NAA + Kinetin	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	1 NAA + 2 Kinetin	10	12.200		
	1 NAA + 1 Kinetin	10		15.400	
	1 NAA + 0,5 Kinetin	10		16.300	16.300
	1 NAA + 3 Kinetin	10		16.700	16.700
	1 NAA + 0 Kinetin	10			17.200
	Sig.		1.000	.129	.292

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

LT 3.3 Data analisis ANOVA persentase eksplan hidup pada kalus biji Jintan Hitam

ANOVA

Persentase eksplan hidup

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6912.000	4	1728.000	5.523	.001
Within Groups	14080.000	45	312.889		
Total	20992.000	49			

Persentase eksplan hidup

	Perlakuan ZPT NAA + Kinetin	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	1 NAA + 0 Kinetin	10	56.00	
	1 NAA + 0,5 Kinetin	10	60.00	
	1 NAA + 1 Kinetin	10	72.00	72.00
	1 NAA + 2 Kinetin	10		84.00
	1 NAA + 3 Kinetin	10		84.00
	Sig.		.159	.061

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

LT 3.4 Data analisis ANOVA persentase eksplan tumbuh kalus biji Jintan Hitam

ANOVA

Persentase eksplan tumbuh kalus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11072.000	4	2768.000	10.965	.000
Within Groups	11360.000	45	252.444		
Total	22432.000	49			

Persentase eksplan tumbuh kalus

	Perlakuan ZPT NAA + Kinetin	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	1 NAA + 0 Kinetin	10	44.00		
	1 NAA + 0,5 Kinetin	10	56.00	56.00	
	1 NAA + 1 Kinetin	10		66.00	
	1 NAA + 3 Kinetin	10			82.00
	1 NAA + 2 Kinetin	10			84.00
	Sig.		.098	.266	.576

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

LT 3.5 Data analisis ANOVA berat basah kalus biji Jintan Hitam

ANOVA

Berat basah kalus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.062	4	.016	18.473	.000
Within Groups	.038	45	.001		
Total	.100	49			

Berat basah kalus

	Perlakuan ZPT NAA + Kinetin	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	1 NAA + 0 Kinetin	10	.08000		
	1 NAA + 0,5 Kinetin	10	.08000		
	1 NAA + 1 Kinetin	10		.12000	
	1 NAA + 3 Kinetin	10		.14000	
	1 NAA + 2 Kinetin	10			.17200
	Sig.		.939	.130	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Lampiran 4. Data SCV Pengamatan Kurva Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Jintan Hitam selama 14 hari Kultur

LT. 4.1 Data persentase SCV pada pengamatan kurva pertumbuhan kultur suspensi sel Jintan Hitam

Ulangan	Waktu kultur (hari)														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	23.3	23.3	26.7	26.7	26.7	33.3	31.7	30.0	36.7	33.3	38.3	38.3	38.3	36.7	36.7
2	25.0	25.0	25.0	26.7	26.7	33.3	33.3	36.7	38.3	38.3	38.3	38.3	38.3	38.3	38.3
3	23.3	23.3	23.3	25.0	28.3	33.3	33.3	36.7	35.0	36.7	38.3	40.0	38.3	40.0	40.0
4	26.7	28.3	28.3	31.7	31.7	31.7	31.7	36.7	36.7	36.7	36.7	40.0	36.7	38.3	38.3
5	23.3	23.3	23.3	28.3	28.3	31.7	33.3	38.3	36.7	38.3	40.0	36.7	36.7	36.7	38.3
6	21.7	21.7	26.7	26.7	26.7	26.7	30.0	30.0	33.3	33.3	40.0	36.7	36.7	40.0	33.3
7	26.7	26.7	28.3	28.3	31.7	40.0	40.0	40.0	36.7	36.7	40.0	40.0	41.7	40.0	38.3
8	21.7	21.7	23.3	26.7	26.7	33.3	31.7	36.7	36.7	36.7	40.0	40.0	41.7	40.0	38.3
9	23.3	25.0	25.0	28.3	28.3	36.7	33.3	40.0	38.3	38.3	40.0	41.7	43.3	46.7	46.7
10	28.3	28.3	30.0	33.3	36.7	36.7	38.3	43.3	43.3	46.7	48.3	48.3	48.3	48.3	46.7
Rata-rata SCV (%)	24.3	24.7	26.0	28.2	29.2	33.7	33.7	36.8	37.2	37.5	40.0	40.0	40.0	40.5	39.5

LT. 4.2 Data analisis ANOVA kurva pertumbuhan kultur suspensi sel Jintan Hitam

persenSCV kurva pertumbuhan kultur sel								
	hariSCV	N	Subset for alpha = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
Duncan ^a	.00	10	24.3333					
	1.00	10	24.6667					
	2.00	10	26.0000	26.0000				
	3.00	10		28.1667	28.1667			
	4.00	10			29.1667			
	6.00	10				33.6667		
	5.00	10				33.6667		
	7.00	10					36.8333	
	8.00	10					37.1667	
	9.00	10					37.5000	
	14.00	10					38.8333	38.8333
	11.00	10					39.6667	39.6667
	10.00	10					40.0000	40.0000
	12.00	10					40.0000	40.0000
	13.00	10						40.5000
	Sig.		.282	.137	.491	1.000	.060	.071

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Lampiran 5. Data dan Analisis ANOVA Pertumbuhan Sel Jintan Hitam setelah Perlakuan Elisitasi

LT 5.1 Data Pengaruh elisitor SA dan MJ terhadap SCV, PCV, BB, BK, IP dan Viabilitas suspensi sel Jintan Hitam

Elisitor	Konsentrasi (μM)	SCV (%)	PCV (mL)	BB (g)	BK (g)	IP	Viabilitas sel (%)
SA	0	11.82±1.875	0.74±0.081	2.20±0.129	0.076±0.018	1.20±0.141	55.43±4.914
	50	10.01±1.281	0.64±0.047	1.89±0.159	0.057±0.018	0.89±0.159	37.78±5.065
	100	9.537±1.015	0.59±0.052	1.77±0.178	0.050±0.014	0.77±0.177	27.04±10.361
	150	9.420±1.089	0.55±0.071	1.67±0.244	0.045±0.011	0.67±0.244	10.29±5.364
	200	9.207±1.161	0.53±0.042	1.58±0.296	0.042±0.013	0.58±0.296	2.80±1.712
MJ	0	11.53±1.163	0.74±0.078	2.22±0.173	0.075±0.031	1.22±0.173	56.67±3.298
	50	9.90±1.174	0.63±0.098	1.83±0.169	0.055±0.019	0.83±0.169	42.49±7.848
	100	9.37±1.281	0.56±0.094	1.74±0.164	0.048±0.016	0.74±0.164	32.82±9.354
	150	9.22±1.273	0.54±0.075	1.65±0.170	0.043±0.016	0.65±0.170	24.94±11.084
	200	8.83±1.312	0.50±0.071	1.51±0.205	0.035±0.016	0.51±0.205	13.69±4.139

LT 5.2 Data analisis ANOVA Hasil SCV dan uji lanjut DMRT suspensi sel jintan hitam setelah perlakuan elisitasi

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Nilai SCV

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	90.577 ^a	9	10.064	6.121	.000
Intercept	9766.974	1	9766.974	5940.589	.000
Elisitor	1.300	1	1.300	.790	.376
konsentrasi	89.048	4	22.262	13.540	.000
elisitor * konsentrasi	.230	4	.057	.035	.998
Error	147.970	90	1.644		
Total	10005.520	100			
Corrected Total	238.547	99			

a. R Squared = .380 (Adjusted R Squared = .318)

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Nilai SCV (MJ)	Between Groups	44.600	4	11.150	7.222	.000
	Within Groups	69.470	45	1.544		
	Total	114.070	49			
Nilai SCV (SA)	Between Groups	44.600	4	11.150	7.222	.000
	Within Groups	69.470	45	1.544		
	Total	114.070	49			

Nilai SCV (MJ)

Duncan

Konsentrasi elisitor	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200 uM	10	8.8270	11.5270
150 uM	10	9.2200	
100 uM	10	9.3660	
50 uM	10	9.9040	
0 uM	10		
Sig.		.082	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Nilai SCV (SA)

Duncan

Konsentrasi elisitor	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200 uM	10	8.8270	11.5270
150 uM	10	9.2200	
100 uM	10	9.3660	
50 uM	10	9.9040	
0 uM	10		
Sig.		.082	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

LT 5.3 Data analisis ANOVA Hasil PCV dan uji lanjut DMRT suspensi sel jintan hitam setelah perlakuan elisitasi

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Nilai PCV

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.640 ^a	9	.071	13.333	.000
Intercept	36.000	1	36.000	6750.000	.000
Elisitor	.006	1	.006	1.200	.276
Konsentrasi	.631	4	.158	29.578	.000
elisitor * konsentrasi	.003	4	.001	.122	.974
Error	.480	90	.005		
Total	37.120	100			
Corrected Total	1.120	99			

a. R Squared = .571 (Adjusted R Squared = .529)

One way

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Nilai PCV (MJ)	Between Groups	.346	4	.087	12.348	.000
	Within Groups	.316	45	.007		
	Total	.662	49			
Nilai PCV (SA)	Between Groups	.287	4	.072	19.648	.000
	Within Groups	.165	45	.004		
	Total	.452	49			

Nilai PCV (MJ)

Duncan

Konsentrasi elisitor	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
200 uM	10	.5000		
150 uM	10	.5350		
100 uM	10	.5600	.5600	
50 uM	10		.6300	
0 uM	10			.7350
Sig.		.137	.068	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Nilai PCV (SA)

Duncan

Konsentrasi elisitor	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
200 uM	10	.5250			
150 uM	10	.5500	.5500		
100 uM	10		.5900	.5900	
50 uM	10			.6350	
0 uM	10				.7400
Sig.		.360	.146	.103	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

LT 5.4 Data analisis ANOVA Hasil berat basah dan uji lanjut DMRT suspensi sel jintan hitam setelah perlakuan elisitasi

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Berat Basah Sel

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4.970 ^a	9	.552	14.637	.000
Intercept	323.788	1	323.788	8582.780	.000
Elisitor	.010	1	.010	.271	.604
konsentrasi	4.910	4	1.228	32.538	.000
elisitor * konsentrasi	.049	4	.012	.328	.859
Error	3.395	90	.038		
Total	332.153	100			
Corrected Total	8.365	99			

a. R Squared = .594 (Adjusted R Squared = .554)

One way

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Berat Basah Sel (MJ)	Between Groups	2.885	4	.721	22.976	.000
	Within Groups	1.413	45	.031		
	Total	4.297	49			
Berat Basah Sel (SA)	Between Groups	2.065	4	.516	11.628	.000
	Within Groups	1.998	45	.044		
	Total	4.062	49			

Berat Basah Sel (MJ)

Duncan

Konsentrasi elisitor	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
200 uM	10	1.5090			
150 uM	10	1.6460	1.6460		
100 uM	10		1.7440	1.7440	
50 uM	10			1.8320	
0 uM	10				2.2200
Sig.		.091	.223	.273	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Berat Basah Sel (SA)

Duncan

Konsentrasi elisitor	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
200 uM	10	1.5830		
150 uM	10	1.6720		
100 uM	10	1.7470	1.7470	
50 uM	10		1.8820	
0 uM	10			2.1987
Sig.		.106	.159	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

LT 5.5 Data analisis ANOVA Hasil Berat kering dan uji lanjut DMRT suspensi sel jintan hitam setelah perlakuan elisitasi

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Berat Kering Sel

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.017 ^a	9	.002	5.951	.000
Intercept	.277	1	.277	863.825	.000
elisitor	.000	1	.000	.639	.426
konsentrasi	.017	4	.004	13.146	.000
elisitor * konsentrasi	.000	4	2.649E-005	.083	.988
Error	.029	90	.000		
Total	.323	100			
Corrected Total	.046	99			

a. R Squared = .373 (Adjusted R Squared = .310)

One way

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Berat Kering Sel (MJ)	Between Groups	.009	4	.002	5.319	.001
	Within Groups	.019	45	.000		
	Total	.028	49			
Berat Kering Sel (SA)	Between Groups	.008	4	.002	8.386	.000
	Within Groups	.010	45	.000		
	Total	.018	49			

Berat Kering Sel (MJ)

Duncan

Konsentrasi elisitor	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200 uM	10	.0370	
150 uM	10	.0430	
100 uM	10	.0480	
50 uM	10	.0540	
0 uM	10		.0760
Sig.		.098	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Berat Kering Sel (SA)

Duncan

Konsentrasi elisitor	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
200 uM	10	.0420		
150 uM	10	.0450	.0450	
100 uM	10	.0520	.0520	
50 uM	10		.0580	
0 uM	10			.0770
Sig.		.171	.076	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

LT 5.6 Data analisis ANOVA Hasil Indeks pertumbuhan dan uji lanjut DMRT suspensi sel jintan hitam setelah perlakuan elisitasi

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Indeks Pertumbuhan

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4.970 ^a	9	.552	14.637	.000
Intercept	63.906	1	63.906	1693.975	.000
elisitor	.010	1	.010	.271	.604
konsentrasi	4.910	4	1.228	32.538	.000
elisitor * konsentrasi	.049	4	.012	.328	.859
Error	3.395	90	.038		
Total	72.271	100			
Corrected Total	8.365	99			

a. R Squared = .594 (Adjusted R Squared = .554)

One way

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Indeks Pertumbuhan (MJ)	Between Groups	2.885	4	.721	22.976	.000
	Within Groups	1.413	45	.031		
	Total	4.297	49			
Indeks Pertumbuhan (SA)	Between Groups	2.065	4	.516	11.628	.000
	Within Groups	1.998	45	.044		
	Total	4.062	49			

Indeks Pertumbuhan (MJ)

Duncan

Konsentrasi elisitor	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
200 uM	10	.5090			
150 uM	10	.6460	.6460		
100 uM	10		.7440	.7440	
50 uM	10			.8320	
0 uM	10				1.2200
Sig.		.091	.223	.273	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Indeks Pertumbuhan (SA)

Duncan

Konsentrasi elisitor	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
200 uM	10	.5830		
150 uM	10	.6720		
100 uM	10	.7470	.7470	
50 uM	10		.8820	
0 uM	10			1.1987
Sig.		.106	.159	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

LT 5.7 Data analisis ANOVA Hasil viabilitas sel dan uji lanjut DMRT suspensi sel jantan hitam setelah perlakuan elisitasi

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Viabilitas sel

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	30101.720 ^a	9	3344.636	68.425	.000
Intercept	92380.628	1	92380.628	1889.947	.000
elisitor	1390.396	1	1390.396	28.445	.000
konsentrasi	28149.075	4	7037.269	143.970	.000
elisitor * konsentrasi	562.249	4	140.562	2.876	.027
Error	4399.201	90	48.880		
Total	126881.549	100			
Corrected Total	34500.921	99			

a. R Squared = .872 (Adjusted R Squared = .860)

Viabilitas sel

	Perlakuan elisitasi	N	Subset for alpha = 0.05						
			1	2	3	4	5	6	7
Duncan ^a	SA 200 uM	10	2.7960						
	SA 150 uM	10		10.2870					
	MJ 200 uM	10		13.6870					
	MJ 150 uM	10			24.9400				
	SA 100 uM	10			27.0350	27.0350			
	MJ 100 uM	10				32.8200	32.8200		
	SA 50 uM	10					37.7810	37.7810	
	MJ 50 uM	10						42.4940	
	SA 0 uM	10							55.4260
	MJ 0 uM	10							56.6750
	Sig.		1.000	.280	.505	.068	.116	.135	.691

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Lampiran 6. Hasil Analisis Independent-sample T-test

LT 6.1 Hasil uji Independent-Sample T-test pada elisitor konsentrasi 0 μM

Independent Samples Test 0 μM

Elisitor 0 μM		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Nilai SCV	Equal variances assumed	2.647	.121	-.410	18	.687	-.28600	.69791	-1.75225	1.18025
	Equal variances not assumed			-.410	15.033	.688	-.28600	.69791	-1.77327	1.20127
Nilai PCV	Equal variances assumed	.003	.958	-.140	18	.890	-.00500	.03563	-.07985	.06985
	Equal variances not assumed			-.140	17.981	.890	-.00500	.03563	-.07986	.06986
Berat Basah Sel	Equal variances assumed	.876	.362	.797	18	.436	.054400	.068272	-.089035	.197835
	Equal variances not assumed			.797	16.672	.437	.054400	.068272	-.089859	.198659
Berat Kering Sel	Equal variances assumed	1.725	.206	-.071	18	.944	-.000800	.011290	-.024520	.022920
	Equal variances not assumed			-.071	14.790	.944	-.000800	.011290	-.024894	.023294
Indeks Pertumbuhan	Equal variances assumed	.876	.362	.797	18	.436	.054400	.068272	-.089035	.197835
	Equal variances not assumed			.797	16.672	.437	.054400	.068272	-.089859	.198659
Viabilitas sel	Equal variances assumed	1.021	.326	.666	18	.514	1.24730	1.87156	-2.68470	5.17930
	Equal variances not assumed			.666	15.740	.515	1.24730	1.87156	-2.72556	5.22016

LT 6.2 Hasil uji Independent-Sample T-test pada elisitor konsentrasi 50 μM

Independent Samples Test 50 μM

Elisitor 50 μM		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Nilai SCV	Equal variances assumed	.013	.911	-.189	18	.852	-.10400	.54914	-1.25770	1.04970
	Equal variances not assumed			-.189	17.866	.852	-.10400	.54914	-1.25832	1.05032
Nilai PCV	Equal variances assumed	4.175	.056	-.146	18	.886	-.00500	.03436	-.07719	.06719
	Equal variances not assumed			-.146	13.016	.887	-.00500	.03436	-.07922	.06922
Berat Basah Sel	Equal variances assumed	.061	.808	-.693	18	.497	-.050800	.073270	-.204734	.103134
	Equal variances not assumed			-.693	17.939	.497	-.050800	.073270	-.204771	.103171
Berat Kering Sel	Equal variances assumed	.601	.448	-.229	18	.821	-.001900	.008282	-.019299	.015499
	Equal variances not assumed			-.229	17.887	.821	-.001900	.008282	-.019307	.015507
Indeks Pertumbuhan	Equal variances assumed	.061	.808	-.693	18	.497	-.050800	.073270	-.204734	.103134
	Equal variances not assumed			-.693	17.939	.497	-.050800	.073270	-.204771	.103171
Viabilitas sel	Equal variances assumed	2.056	.169	1.595	18	.128	4.71250	2.95362	-1.49284	10.91784
	Equal variances not assumed			1.595	15.388	.131	4.71250	2.95362	-1.56920	10.99420

LT 6.3 Hasil uji Independent-Sample T-test pada elisitor konsentrasi 100 μM

Independent Samples Test 100 μM

Elisitor 100 μM		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Nilai SCV	Equal variances assumed	1.510	.235	-.330	18	.745	-.17100	.51743	-1.25808	.91608
	Equal variances not assumed			-.330	17.100	.745	-.17100	.51743	-1.26219	.92019
Nilai PCV	Equal variances assumed	3.053	.098	-.887	18	.387	-.03000	.03383	-.10107	.04107
	Equal variances not assumed			-.887	14.006	.390	-.03000	.03383	-.10255	.04255
Berat Basah Sel	Equal variances assumed	.010	.923	-.046	18	.964	-.003500	.076594	-.164418	.157418
	Equal variances not assumed			-.046	17.884	.964	-.003500	.076594	-.164493	.157493
Berat Kering Sel	Equal variances assumed	.118	.735	-.392	18	.700	-.002600	.006636	-.016542	.011342
	Equal variances not assumed			-.392	17.848	.700	-.002600	.006636	-.016550	.011350
Indeks Pertumbuhan	Equal variances assumed	.010	.923	-.046	18	.964	-.003500	.076594	-.164418	.157418
	Equal variances not assumed			-.046	17.884	.964	-.003500	.076594	-.164493	.157493
Viabilitas sel	Equal variances assumed	.000	.989	1.310	18	.207	5.78452	4.41415	-3.48926	15.05830
	Equal variances not assumed			1.310	17.815	.207	5.78452	4.41415	-3.49616	15.06519

LT 6.4 Hasil uji Independent-Sample T-test pada elisitor konsentrasi 150 μM

Independent Samples Test 150 μM

Elisitor 150 μM		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Nilai SCV	Equal variances assumed	.816	.378	-.376	18	.712	-.19900	.52991	-1.31229	.91429
	Equal variances not assumed			-.376	17.573	.712	-.19900	.52991	-1.31423	.91623
Nilai PCV	Equal variances assumed	.132	.720	-.461	18	.650	-.01500	.03253	-.08335	.05335
	Equal variances not assumed			-.461	17.945	.650	-.01500	.03253	-.08336	.05336
Berat Basah Sel	Equal variances assumed	1.646	.216	-.271	18	.790	-.025500	.094116	-.223230	.172230
	Equal variances not assumed			-.271	16.067	.790	-.025500	.094116	-.224948	.173948
Berat Kering Sel	Equal variances assumed	1.911	.184	-.354	18	.727	-.002200	.006212	-.015251	.010851
	Equal variances not assumed			-.354	16.020	.728	-.002200	.006212	-.015367	.010967
Indeks Pertumbuhan	Equal variances assumed	1.646	.216	-.271	18	.790	-.025500	.094116	-.223230	.172230
	Equal variances not assumed			-.271	16.067	.790	-.025500	.094116	-.224948	.173948
Viabilitas sel	Equal variances assumed	5.489	.031	3.763	18	.001	14.65130	3.89392	6.47048	22.83212
	Equal variances not assumed			3.763	12.997	.002	14.65130	3.89392	6.23879	23.06381

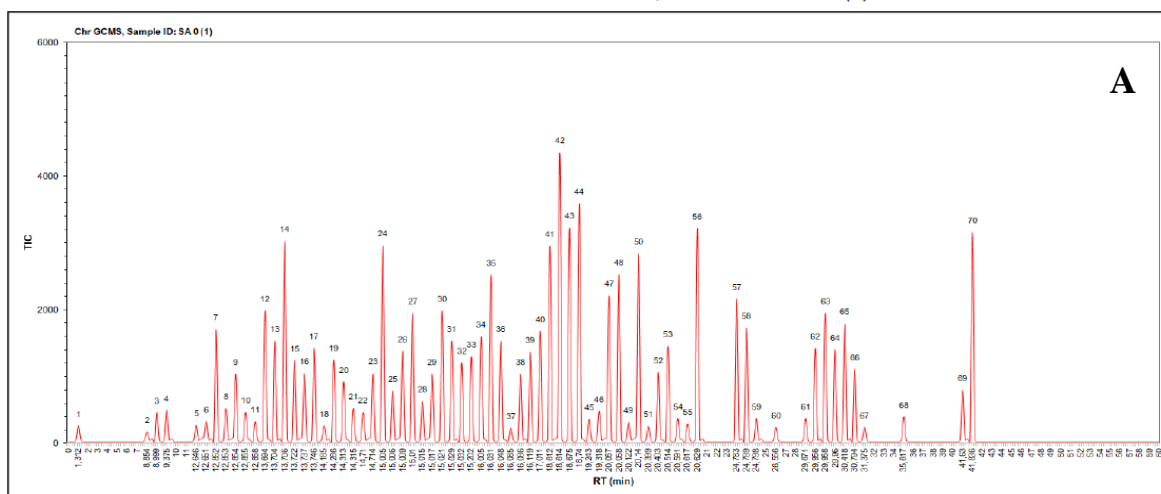
LT 6.5 Hasil uji Independent-Sample T-test pada elisitor konsentrasi 200 μ M

Independent Samples Test 200 μ M

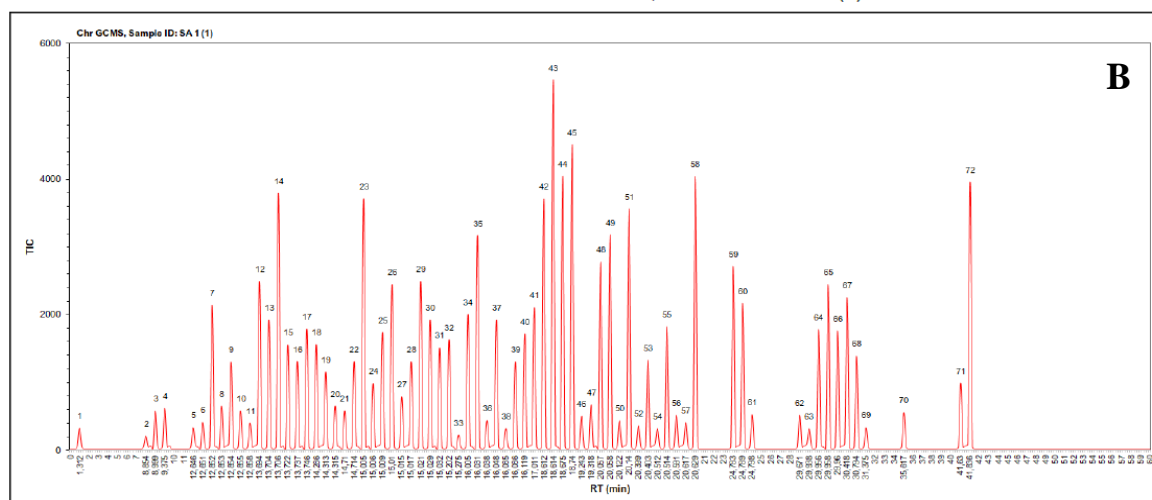
Elisitor 200 μ M		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Nilai SCV	Equal variances assumed	.017	.897	-.686	18	.502	-.38000	.55403	-1.54397	.78397
	Equal variances not assumed			-.686	17.742	.502	-.38000	.55403	-1.54518	.78518
Nilai PCV	Equal variances assumed	.844	.370	-.958	18	.351	-.02500	.02609	-.07981	.02981
	Equal variances not assumed			-.958	14.750	.353	-.02500	.02609	-.08069	.03069
Berat Basah Sel	Equal variances assumed	2.694	.118	-.665	18	.515	-.075700	.113891	-.314977	.163577
	Equal variances not assumed			-.665	16.046	.516	-.075700	.113891	-.317083	.165683
Berat Kering Sel	Equal variances assumed	1.391	.254	-1.056	18	.305	-.006800	.006441	-.020332	.006732
	Equal variances not assumed			-1.056	17.414	.306	-.006800	.006441	-.020365	.006765
Indeks Pertumbuhan	Equal variances assumed	2.694	.118	-.665	18	.515	-.075700	.113891	-.314977	.163577
	Equal variances not assumed			-.665	16.046	.516	-.075700	.113891	-.317083	.165683
Viabilitas sel	Equal variances assumed	3.620	.073	7.690	18	.000	10.89240	1.41637	7.91672	13.86808
	Equal variances not assumed			7.690	11.994	.000	10.89240	1.41637	7.80622	13.97858

Lampiran 7. Hasil Analisis GC-MS Suspensi Sel Jintan Hitam setelah Perlakuan Elisitasi

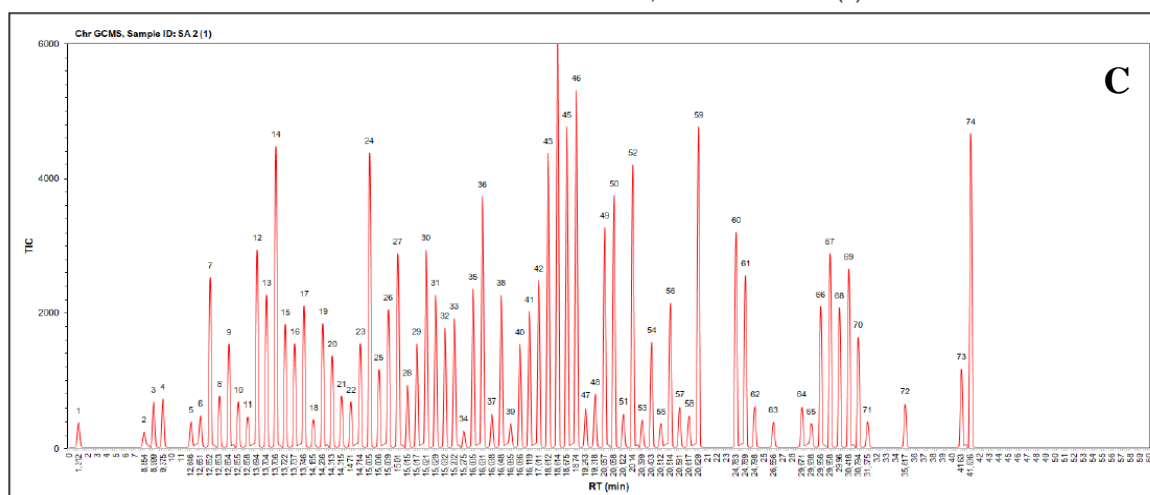
GCMS CHROMATOGRAM RESULT, SAMPLE ID: SA 0 (1)



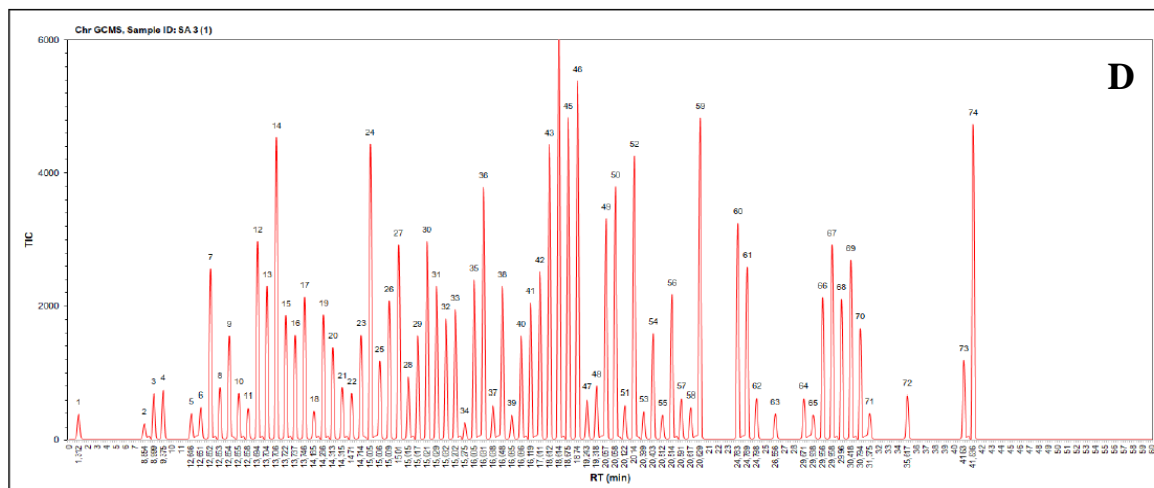
GCMS CHROMATOGRAM RESULT, SAMPLE ID: SA 1 (1)



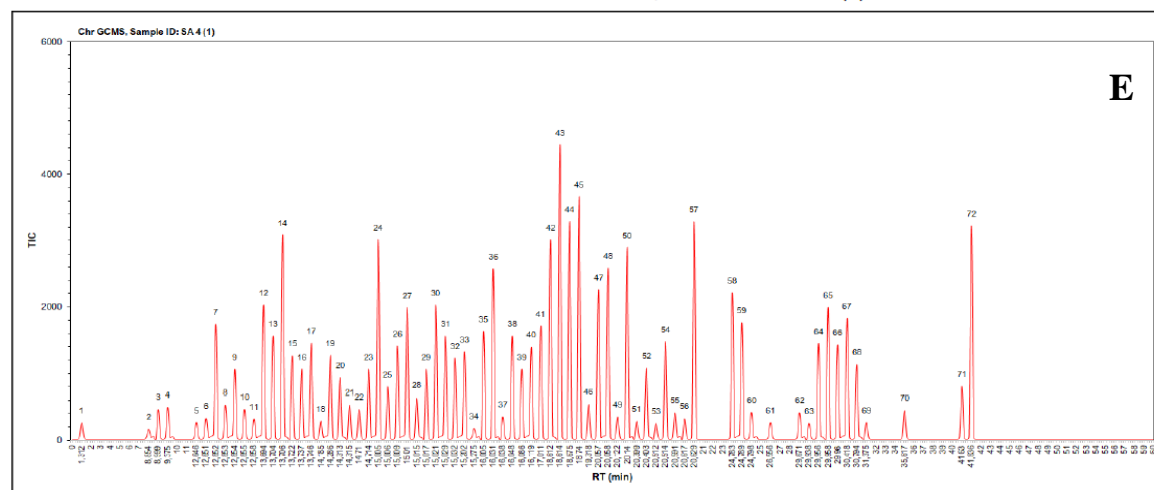
GCMS CHROMATOGRAM RESULT, SAMPLE ID: SA 2 (1)



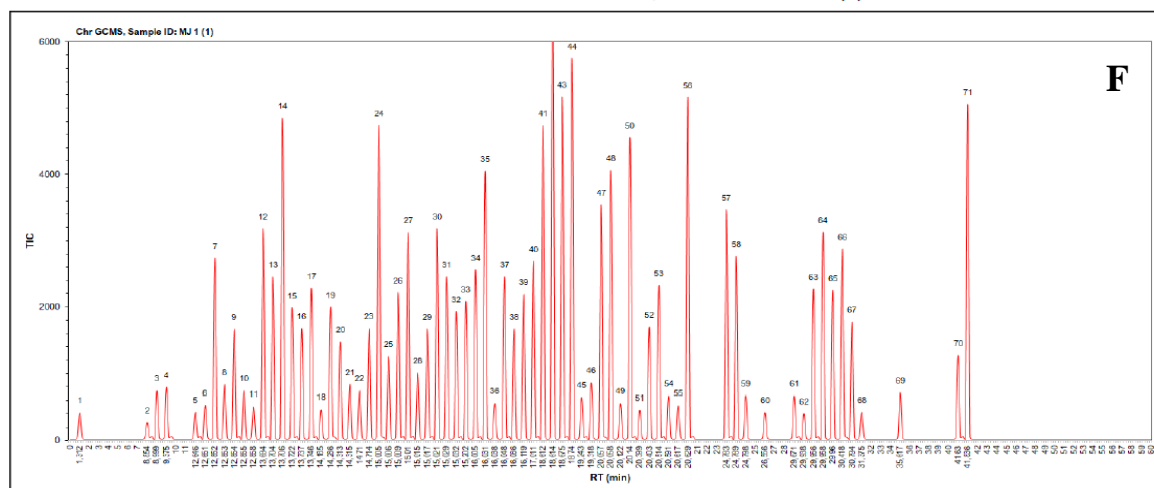
GCMS CHROMATOGRAM RESULT, SAMPLE ID: SA 3 (1)



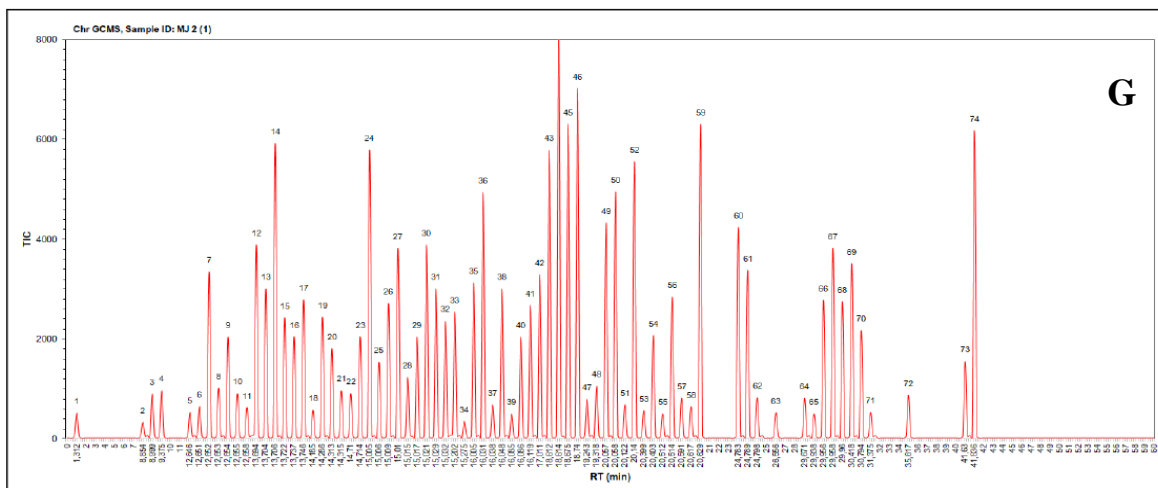
GCMS CHROMATOGRAM RESULT, SAMPLE ID: SA 4 (1)



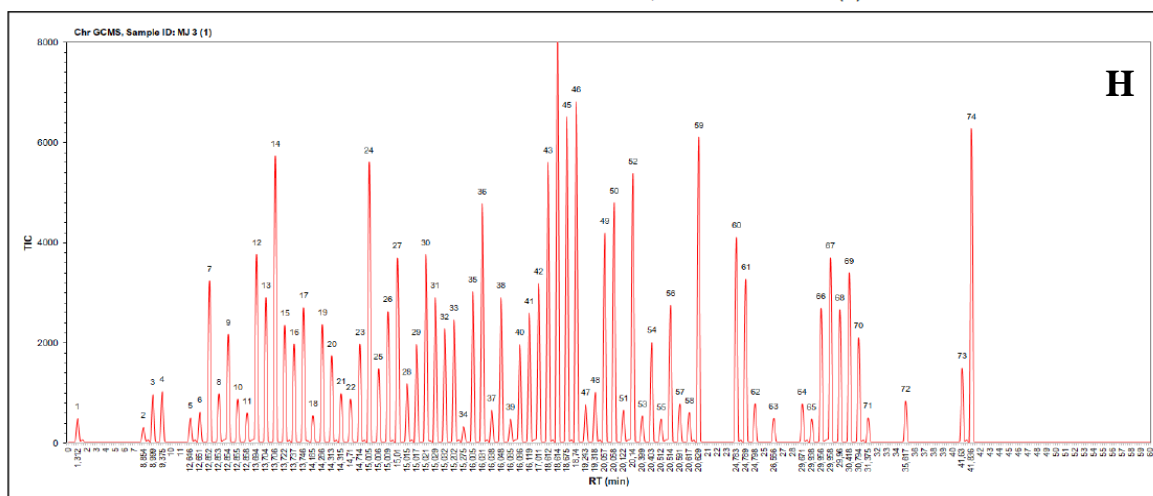
GCMS CHROMATOGRAM RESULT, SAMPLE ID: MJ 1 (1)



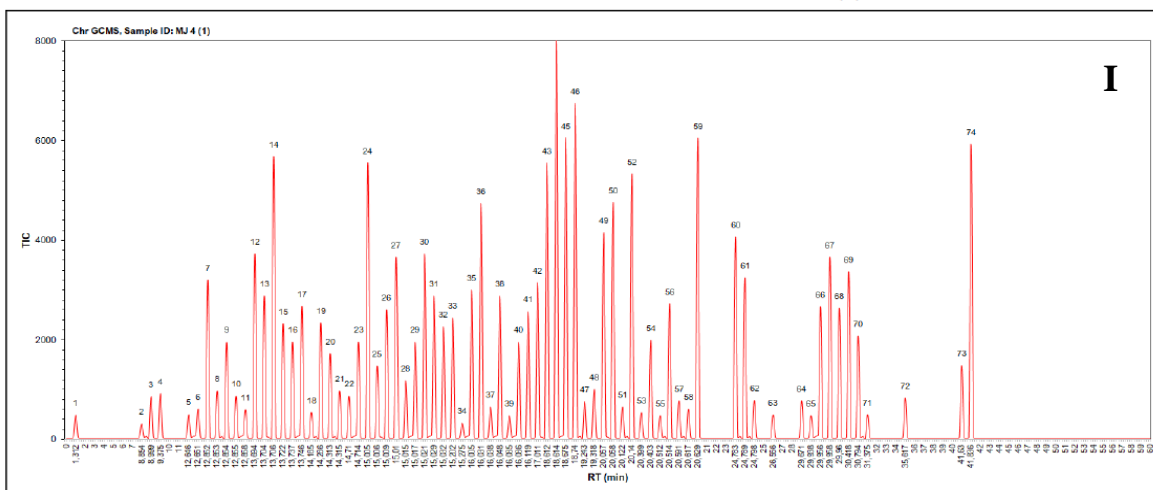
GCMS CHROMATOGRAM RESULT, SAMPLE ID: MJ 2 (1)



GCMS CHROMATOGRAM RESULT, SAMPLE ID: MJ 3 (1)



GCMS CHROMATOGRAM RESULT, SAMPLE ID: MJ 4 (1)



LG. 5.1 Kromatogram minyak jintan hitam hasil analisis GC-MS suspensi sel jintan hitam
Keterangan: (A) Kontrol (B) SA 50 μ M; (C) SA 100 μ M; (D) SA 150 μ M; (E) SA 200 μ M dan (F) MJ 50 μ M; (G) MJ 100 μ M; (H) MJ 150 μ M dan (I) MJ 200 μ M.

Lampiran 8. Kuantifikasi komponen utama minyak atsiri jintan hitam

LT 8.1 Kuantifikasi kromatogram GC-MS biji jintan hitam

Table 1 GCMS Chromatogram Quantitation Result

Sample ID	Sample volume (µl)	RT (min)	Sample curve area	Result (µg/ml)	Compound	Peak number
Biji JH	1	9,375	549,83377	0,10743	p-cymene	1
	1	13,694	2205,56188	0,45120	α-thujene	2
	1	13,706	3357,59876	0,71757	β-pinene	3
	1	15,005	3285,20224	0,64208	thymol	4
	1	18,614	4833,92179	1,31728	thymoquinone	5

Table 2 p-Cymene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
p-cymene	nd	0	0	a	1,24955
	9,375	0,1	1,94265	b	5,10621
	9,375	0,5	4,21365	R ²	0,99474
	9,375	1	6,85165	Dilution factor	1
	9,375	2,5	14,62328	Injection vol (µl)	1
	9,375	5	26,33254	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,24955}{5,10621 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 3 α-Thujene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
α-thujene	nd	0	0	a	1,58298
	13,694	0,1	2,12216	b	4,88469
	13,694	0,5	4,86325	R ²	0,99090
	13,694	1	7,32251	Dilution factor	1
	13,694	2,5	13,98525	Injection vol (µl)	1
	13,694	5	25,65536	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,58298}{4,88469 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 4 β-Pinene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
β-pinene	nd	0	0	a	1,52683
	13,706	0,1	2,01548	b	4,67697
	13,706	0,5	4,68836	R ²	0,99070
	13,706	1	6,95245	Dilution factor	1
	13,706	2,5	13,55254	Injection vol (µl)	1
	13,706	5	24,5126	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,52683}{4,67697 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 5 Thymol Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymol	nd	0	0	a	1,23556
	15,005	0,1	1,30252	b	5,11456
	15,005	0,5	3,84526	R ²	0,98817
	15,005	1	7,51125	Dilution factor	1
	15,005	2,5	15,41213	Injection vol (µl)	1
	15,005	5	25,88469	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,23556}{5,11456 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 6 Thymoquinone Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymoquinone	nd	0	0	a	0,50899
	18,614	0,1	0,82685	b	3,66924
	18,614	0,5	2,11265	R ²	0,99573
	18,614	1	4,86528	Dilution factor	1
	18,614	2,5	10,11265	Injection vol (µl)	1
	18,614	5	18,52655	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 0,50899}{3,66924 \times \text{sample volume} \times 1000}$

LT 8.2 Kuantifikasi kromatogram GC-MS suspensi sel (Kontrol)

Table 1 GCMS Chromatogram Quantitation Result

Sample ID	Sample volume (µl)	RT (min)	Sample curve area	Result (µg/ml)	Compound	Peak number
SA 0 (1)	1	9,375	494,85039	0,09667	p-cymene	1
	1	13,694	1985,00569	0,40605	α-thujene	2
	1	13,706	3021,83888	0,64578	β-pinene	3
	1	15,005	2956,68201	0,57785	thymol	4
	1	18,614	4350,52961	1,18554	thymoquinone	5

Table 2 p-Cymene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
p-cymene	nd	0	0	a	1,24955
	9,375	0,1	1,94265	b	5,10621
	9,375	0,5	4,21365	R ²	0,99474
	9,375	1	6,85165	Dilution factor	1
	9,375	2,5	14,62328	Injection vol (µl)	1
	9,375	5	26,33254	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,24955}{5,10621 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 3 α-Thujene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
α-thujene	nd	0	0	a	1,58298
	13,694	0,1	2,12216	b	4,88469
	13,694	0,5	4,86325	R ²	0,99090
	13,694	1	7,32251	Dilution factor	1
	13,694	2,5	13,98525	Injection vol (µl)	1
	13,694	5	25,65536	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,58298}{4,88469 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 4 β-Pinene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
β-pinene	nd	0	0	a	1,52683
	13,706	0,1	2,01548	b	4,67697
	13,706	0,5	4,68836	R ²	0,99070
	13,706	1	6,95245	Dilution factor	1
	13,706	2,5	13,55254	Injection vol (µl)	1
	13,706	5	24,5126	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,52683}{4,67697 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 5 Thymol Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymol	nd	0	0	a	1,23556
	15,005	0,1	1,30252	b	5,11456
	15,005	0,5	3,84526	R ²	0,98817
	15,005	1	7,51125	Dilution factor	1
	15,005	2,5	15,41213	Injection vol (µl)	1
	15,005	5	25,88469	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,23556}{5,11456 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 6 Thymoquinone Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymoquinone	nd	0	0	a	0,50899
	18,614	0,1	0,82685	b	3,66924
	18,614	0,5	2,11265	R ²	0,99573
	18,614	1	4,86528	Dilution factor	1
	18,614	2,5	10,11265	Injection vol (µl)	1
	18,614	5	18,52655	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 0,50899}{3,66924 \times \text{sample volume} \times 1000}$

LT 8.3 Kuantifikasi kromatogram GC-MS perlakuan SA 50 μM

Table 1 GCMS Chromatogram Quantitation Result

Sample ID	Sample volume (μl)	RT (min)	Sample curve area	Result ($\mu\text{g/ml}$)	Compound	Peak number
SA 1 (1)	1	9,375	621,31216	0,12143	p-cymene	1
	1	13,694	2492,28492	0,50990	α -thujene	2
	1	13,706	3794,08659	0,81090	β -pinene	3
	1	15,005	3712,27853	0,72558	thymol	4
	1	18,614	5462,33162	1,48854	thymoquinone	5

Table 2 p-Cymene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
p-cymene	nd	0	0	a	1,24955
	9,375	0,1	1,94265	b	5,10621
	9,375	0,5	4,21365	R ²	0,99474
	9,375	1	6,85165	Dilution factor	1
	9,375	2,5	14,62328	Injection vol (μl)	1
	9,375	5	26,33254	Equation ($\mu\text{g/ml}$)	$\frac{\text{curve area} - 1,24955}{5,10621 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 3 α -Thujene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
α -thujene	nd	0	0	a	1,58298
	13,694	0,1	2,12216	b	4,88469
	13,694	0,5	4,86325	R ²	0,99090
	13,694	1	7,32251	Dilution factor	1
	13,694	2,5	13,98525	Injection vol (μl)	1
	13,694	5	25,65536	Equation ($\mu\text{g/ml}$)	$\frac{\text{curve area} - 1,58298}{4,88469 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 4 β -Pinene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
β -pinene	nd	0	0	a	1,52683
	13,706	0,1	2,01548	b	4,67697
	13,706	0,5	4,68836	R ²	0,99070
	13,706	1	6,95245	Dilution factor	1
	13,706	2,5	13,55254	Injection vol (μl)	1
	13,706	5	24,5126	Equation ($\mu\text{g/ml}$)	$\frac{\text{curve area} - 1,52683}{4,67697 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 5 Thymol Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymol	nd	0	0	a	1,23556
	15,005	0,1	1,30252	b	5,11456
	15,005	0,5	3,84526	R ²	0,98817
	15,005	1	7,51125	Dilution factor	1
	15,005	2,5	15,41213	Injection vol (μl)	1
	15,005	5	25,88469	Equation ($\mu\text{g/ml}$)	$\frac{\text{curve area} - 1,23556}{5,11456 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 6 Thymoquinone Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymoquinone	nd	0	0	a	0,50899
	18,614	0,1	0,82685	b	3,66924
	18,614	0,5	2,11265	R ²	0,99573
	18,614	1	4,86528	Dilution factor	1
	18,614	2,5	10,11265	Injection vol (μl)	1
	18,614	5	18,52655	Equation ($\mu\text{g/ml}$)	$\frac{\text{curve area} - 0,50899}{3,66924 \times \text{sample volume} \times 1000}$

LT 8.4 Kuantifikasi kromatogram GC-MS perlakuan SA 100 μM

Table 1 GCMS Chromatogram Quantitation Result

Sample ID	Sample volume (μl)	RT (min)	Sample curve area	Result ($\mu\text{g/ml}$)	Compound	Peak number
SA 2 (1)	1	9,375	733,14834	0,14334	p-cymene	1
	1	13,694	2940,89627	0,60174	α -thujene	2
	1	13,706	4477,02217	0,95692	β -pinene	3
	1	15,005	4380,48866	0,85623	thymol	4
	1	18,614	6445,55131	1,75651	thymoquinone	5

Table 2 p-Cymene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
p-cymene	nd	0	0	a	1,24955
	9,375	0,1	1,94265	b	5,10621
	9,375	0,5	4,21365	R ²	0,99474
	9,375	1	6,85165	Dilution factor	1
	9,375	2,5	14,62328	Injection vol (μl)	1
	9,375	5	26,33254	Equation ($\mu\text{g/ml}$)	$\frac{\text{curve area} - 1,24955}{5,10621 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 3 α -Thujene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
α -thujene	nd	0	0	a	1,58298
	13,694	0,1	2,12216	b	4,88469
	13,694	0,5	4,86325	R ²	0,99090
	13,694	1	7,32251	Dilution factor	1
	13,694	2,5	13,98525	Injection vol (μl)	1
	13,694	5	25,65536	Equation ($\mu\text{g/ml}$)	$\frac{\text{curve area} - 1,58298}{4,88469 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 4 β -Pinene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
β -pinene	nd	0	0	a	1,52683
	13,706	0,1	2,01548	b	4,67697
	13,706	0,5	4,68836	R ²	0,99070
	13,706	1	6,95245	Dilution factor	1
	13,706	2,5	13,55254	Injection vol (μl)	1
	13,706	5	24,5126	Equation ($\mu\text{g/ml}$)	$\frac{\text{curve area} - 1,52683}{4,67697 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 5 Thymol Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymol	nd	0	0	a	1,23556
	15,005	0,1	1,30252	b	5,11456
	15,005	0,5	3,84526	R ²	0,98817
	15,005	1	7,51125	Dilution factor	1
	15,005	2,5	15,41213	Injection vol (μl)	1
	15,005	5	25,88469	Equation ($\mu\text{g/ml}$)	$\frac{\text{curve area} - 1,23556}{5,11456 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 6 Thymoquinone Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymoquinone	nd	0	0	a	0,50899
	18,614	0,1	0,82685	b	3,66924
	18,614	0,5	2,11265	R ²	0,99573
	18,614	1	4,86528	Dilution factor	1
	18,614	2,5	10,11265	Injection vol (μl)	1
	18,614	5	18,52655	Equation ($\mu\text{g/ml}$)	$\frac{\text{curve area} - 0,50899}{3,66924 \times \text{sample volume} \times 1000}$

LT 8.5 Kuantifikasi kromatogram GC-MS perlakuan SA 150 µM

Table 1 GCMS Chromatogram Quantitation Result

Sample ID	Sample volume (µl)	RT (min)	Sample curve area	Result (µg/ml)	Compound	Peak number
SA 3 (1)	1	9,375	742,27558	0,14512	p-cymene	1
	1	13,694	2977,50853	0,60924	α-thujene	2
	1	13,706	4532,75832	0,96884	β-pinene	3
	1	15,005	4435,02302	0,86690	thymol	4
	1	18,614	6525,79441	1,77838	thymoquinone	5

Table 2 p-Cymene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
p-cymene	nd	0	0	a	1,24955
	9,375	0,1	1,94265	b	5,10621
	9,375	0,5	4,21365	R ²	0,99474
	9,375	1	6,85165	Dilution factor	1
	9,375	2,5	14,62328	Injection vol (µl)	1
	9,375	5	26,33254	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,24955}{5,10621 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 3 α-Thujene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
α-thujene	nd	0	0	a	1,58298
	13,694	0,1	2,12216	b	4,88469
	13,694	0,5	4,86325	R ²	0,99090
	13,694	1	7,32251	Dilution factor	1
	13,694	2,5	13,98525	Injection vol (µl)	1
	13,694	5	25,65536	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,58298}{4,88469 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 4 β-Pinene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
β-pinene	nd	0	0	a	1,52683
	13,706	0,1	2,01548	b	4,67697
	13,706	0,5	4,68836	R ²	0,99070
	13,706	1	6,95245	Dilution factor	1
	13,706	2,5	13,55254	Injection vol (µl)	1
	13,706	5	24,5126	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,52683}{4,67697 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 5 Thymol Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymol	nd	0	0	a	1,23556
	15,005	0,1	1,30252	b	5,11456
	15,005	0,5	3,84526	R ²	0,98817
	15,005	1	7,51125	Dilution factor	1
	15,005	2,5	15,41213	Injection vol (µl)	1
	15,005	5	25,88469	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,23556}{5,11456 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 6 Thymoquinone Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymoquinone	nd	0	0	a	0,50899
	18,614	0,1	0,82685	b	3,66924
	18,614	0,5	2,11265	R ²	0,99573
	18,614	1	4,86528	Dilution factor	1
	18,614	2,5	10,11265	Injection vol (µl)	1
	18,614	5	18,52655	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 0,50899}{3,66924 \times \text{sample volume} \times 1000}$

LT 8.6 Kuantifikasi kromatogram GC-MS perlakuan SA 200 µM

Table 1 GCMS Chromatogram Quantitation Result

Sample ID	Sample volume (µl)	RT (min)	Sample curve area	Result (µg/ml)	Compound	Peak number
SA 4 (1)	1	9,375	505,84706	0,09882	p-cymene	1
	1	13,694	2029,11692	0,41508	α-thujene	2
	1	13,706	3088,99085	0,66014	β-pinene	3
	1	15,005	3022,38606	0,59070	thymol	4
	1	18,614	4447,20804	1,21189	thymoquinone	5

Table 2 p-Cymene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
p-cymene	nd	0	0	a	1,24955
	9,375	0,1	1,94265	b	5,10621
	9,375	0,5	4,21365	R ²	0,99474
	9,375	1	6,85165	Dilution factor	1
	9,375	2,5	14,62328	Injection vol (µl)	1
	9,375	5	26,33254	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,24955}{5,10621 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 3 α-Thujene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
α-thujene	nd	0	0	a	1,58298
	13,694	0,1	2,12216	b	4,88469
	13,694	0,5	4,86325	R ²	0,99090
	13,694	1	7,32251	Dilution factor	1
	13,694	2,5	13,98525	Injection vol (µl)	1
	13,694	5	25,65536	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,58298}{4,88469 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 4 β-Pinene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
β-pinene	nd	0	0	a	1,52683
	13,706	0,1	2,01548	b	4,67697
	13,706	0,5	4,68836	R ²	0,99070
	13,706	1	6,95245	Dilution factor	1
	13,706	2,5	13,55254	Injection vol (µl)	1
	13,706	5	24,5126	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,52683}{4,67697 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 5 Thymol Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymol	nd	0	0	a	1,23556
	15,005	0,1	1,30252	b	5,11456
	15,005	0,5	3,84526	R ²	0,98817
	15,005	1	7,51125	Dilution factor	1
	15,005	2,5	15,41213	Injection vol (µl)	1
	15,005	5	25,88469	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,23556}{5,11456 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 6 Thymoquinone Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymoquinone	nd	0	0	a	0,50899
	18,614	0,1	0,82685	b	3,66924
	18,614	0,5	2,11265	R ²	0,99573
	18,614	1	4,86528	Dilution factor	1
	18,614	2,5	10,11265	Injection vol (µl)	1
	18,614	5	18,52655	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 0,50899}{3,66924 \times \text{sample volume} \times 1000}$

LT 8.7 Kuantifikasi kromatogram GC-MS perlakuan MJ 50 µM

Table 1 GCMS Chromatogram Quantitation Result

Sample ID	Sample volume (µl)	RT (min)	Sample curve area	Result (µg/ml)	Compound	Peak number
MJ 1 (1)	1	9,375	793,99964	0,15525	p-cymene	1
	1	13,694	3184,99065	0,65171	α-thujene	2
	1	13,706	4848,61507	1,03637	β-pinene	3
	1	15,005	4744,06921	0,92732	thymol	4
	1	18,614	6980,53206	1,90231	thymoquinone	5

Table 2 p-Cymene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
p-cymene	nd	0	0	a	1,24955
	9,375	0,1	1,94265	b	5,10621
	9,375	0,5	4,21365	R ²	0,99474
	9,375	1	6,85165	Dilution factor	1
	9,375	2,5	14,62328	Injection vol (µl)	1
	9,375	5	26,33254	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,24955}{5,10621 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 3 α-Thujene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
α-thujene	nd	0	0	a	1,58298
	13,694	0,1	2,12216	b	4,88469
	13,694	0,5	4,86325	R ²	0,99090
	13,694	1	7,32251	Dilution factor	1
	13,694	2,5	13,98525	Injection vol (µl)	1
	13,694	5	25,65536	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,58298}{4,88469 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 4 β-Pinene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
β-pinene	nd	0	0	a	1,52683
	13,706	0,1	2,01548	b	4,67697
	13,706	0,5	4,68836	R ²	0,99070
	13,706	1	6,95245	Dilution factor	1
	13,706	2,5	13,55254	Injection vol (µl)	1
	13,706	5	24,5126	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,52683}{4,67697 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 5 Thymol Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymol	nd	0	0	a	1,23556
	15,005	0,1	1,30252	b	5,11456
	15,005	0,5	3,84526	R ²	0,98817
	15,005	1	7,51125	Dilution factor	1
	15,005	2,5	15,41213	Injection vol (µl)	1
	15,005	5	25,88469	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,23556}{5,11456 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 6 Thymoquinone Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymoquinone	nd	0	0	a	0,50899
	18,614	0,1	0,82685	b	3,66924
	18,614	0,5	2,11265	R ²	0,99573
	18,614	1	4,86528	Dilution factor	1
	18,614	2,5	10,11265	Injection vol (µl)	1
	18,614	5	18,52655	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 0,50899}{3,66924 \times \text{sample volume} \times 1000}$

LT 8.8 Kuantifikasi kromatogram GC-MS perlakuan MJ 100 μ M

Table 1 GCMS Chromatogram Quantitation Result

Sample ID	Sample volume (μ l)	RT (min)	Sample curve area	Result (μ g/ml)	Compound	Peak number
MJ 2 (1)	1	9,375	968,67956	0,18946	p-cymene	1
	1	13,694	3885,68859	0,79516	α -thujene	2
	1	13,706	5915,31038	1,26445	β -pinene	3
	1	15,005	5787,76443	1,13138	thymol	4
	1	18,614	8516,24911	2,32085	thymoquinone	5

Table 2 p-Cymene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
p-cymene	nd	0	0	a	1,24955
	9,375	0,1	1,94265	b	5,10621
	9,375	0,5	4,21365	R ²	0,99474
	9,375	1	6,85165	Dilution factor	1
	9,375	2,5	14,62328	Injection vol (μ l)	1
	9,375	5	26,33254	Equation (μ g/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,24955}{5,10621 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 3 α -Thujene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
α -thujene	nd	0	0	a	1,58298
	13,694	0,1	2,12216	b	4,88469
	13,694	0,5	4,86325	R ²	0,99090
	13,694	1	7,32251	Dilution factor	1
	13,694	2,5	13,98525	Injection vol (μ l)	1
	13,694	5	25,65536	Equation (μ g/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,58298}{4,88469 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 4 β -Pinene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
β -pinene	nd	0	0	a	1,52683
	13,706	0,1	2,01548	b	4,67697
	13,706	0,5	4,68836	R ²	0,99070
	13,706	1	6,95245	Dilution factor	1
	13,706	2,5	13,55254	Injection vol (μ l)	1
	13,706	5	24,5126	Equation (μ g/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,52683}{4,67697 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 5 Thymol Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymol	nd	0	0	a	1,23556
	15,005	0,1	1,30252	b	5,11456
	15,005	0,5	3,84526	R ²	0,98817
	15,005	1	7,51125	Dilution factor	1
	15,005	2,5	15,41213	Injection vol (μ l)	1
	15,005	5	25,88469	Equation (μ g/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,23556}{5,11456 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 6 Thymoquinone Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymoquinone	nd	0	0	a	0,50899
	18,614	0,1	0,82685	b	3,66924
	18,614	0,5	2,11265	R ²	0,99573
	18,614	1	4,86528	Dilution factor	1
	18,614	2,5	10,11265	Injection vol (μ l)	1
	18,614	5	18,52655	Equation (μ g/ml)	$\frac{\text{curve area} - 0,50899}{3,66924 \times \text{sample volume} \times 1000}$

LT 8.9 Kuantifikasi kromatogram GC-MS perlakuan MJ 150 µM

Table 1 GCMS Chromatogram Quantitation Result

Sample ID	Sample volume (µl)	RT (min)	Sample curve area	Result (µg/ml)	Compound	Peak number
MJ 3 (1)	1	9,375	1040,26274	0,20348	p-cymene	1
	1	13,694	3771,69945	0,77182	α-thujene	2
	1	13,706	5741,78093	1,22734	β-pinene	3
	1	15,005	5617,97669	1,09819	thymol	4
	1	18,614	8666,41954	2,36177	thymoquinone	5

Table 2 p-Cymene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
p-cymene	nd	0	0	a	1,24955
	9,375	0,1	1,94265	b	5,10621
	9,375	0,5	4,21365	R ²	0,99474
	9,375	1	6,85165	Dilution factor	1
	9,375	2,5	14,62328	Injection vol (µl)	1
	9,375	5	26,33254	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,24955}{5,10621 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 3 α-Thujene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
α-thujene	nd	0	0	a	1,58298
	13,694	0,1	2,12216	b	4,88469
	13,694	0,5	4,86325	R ²	0,99090
	13,694	1	7,32251	Dilution factor	1
	13,694	2,5	13,98525	Injection vol (µl)	1
	13,694	5	25,65536	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,58298}{4,88469 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 4 β-Pinene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
β-pinene	nd	0	0	a	1,52683
	13,706	0,1	2,01548	b	4,67697
	13,706	0,5	4,68836	R ²	0,99070
	13,706	1	6,95245	Dilution factor	1
	13,706	2,5	13,55254	Injection vol (µl)	1
	13,706	5	24,5126	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,52683}{4,67697 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 5 Thymol Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymol	nd	0	0	a	1,23556
	15,005	0,1	1,30252	b	5,11456
	15,005	0,5	3,84526	R ²	0,98817
	15,005	1	7,51125	Dilution factor	1
	15,005	2,5	15,41213	Injection vol (µl)	1
	15,005	5	25,88469	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,23556}{5,11456 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 6 Thymoquinone Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymoquinone	nd	0	0	a	0,50899
	18,614	0,1	0,82685	b	3,66924
	18,614	0,5	2,11265	R ²	0,99573
	18,614	1	4,86528	Dilution factor	1
	18,614	2,5	10,11265	Injection vol (µl)	1
	18,614	5	18,52655	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 0,50899}{3,66924 \times \text{sample volume} \times 1000}$

LT 8.10 Kuantifikasi kromatogram GC-MS perlakuan MJ 200 µM

Table 1 GCMS Chromatogram Quantitation Result

Sample ID	Sample volume (µl)	RT (min)	Sample curve area	Result (µg/ml)	Compound	Peak number
MJ 4 (1)	1	9,375	929,93237	0,18187	p-cymene	1
	1	13,694	3730,26104	0,76334	α-thujene	2
	1	13,706	5678,69796	1,21386	β-pinene	3
	1	15,005	5556,25385	1,08612	thymol	4
	1	18,614	8175,59914	2,22801	thymoquinone	5

Table 2 p-Cymene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
p-cymene	nd	0	0	a	1,24955
	9,375	0,1	1,94265	b	5,10621
	9,375	0,5	4,21365	R ²	0,99474
	9,375	1	6,85165	Dilution factor	1
	9,375	2,5	14,62328	Injection vol (µl)	1
	9,375	5	26,33254	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,24955}{5,10621 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 3 α-Thujene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
α-thujene	nd	0	0	a	1,58298
	13,694	0,1	2,12216	b	4,88469
	13,694	0,5	4,86325	R ²	0,99090
	13,694	1	7,32251	Dilution factor	1
	13,694	2,5	13,98525	Injection vol (µl)	1
	13,694	5	25,65536	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,58298}{4,88469 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 4 β-Pinene Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
β-pinene	nd	0	0	a	1,52683
	13,706	0,1	2,01548	b	4,67697
	13,706	0,5	4,68836	R ²	0,99070
	13,706	1	6,95245	Dilution factor	1
	13,706	2,5	13,55254	Injection vol (µl)	1
	13,706	5	24,5126	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,52683}{4,67697 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 5 Thymol Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymol	nd	0	0	a	1,23556
	15,005	0,1	1,30252	b	5,11456
	15,005	0,5	3,84526	R ²	0,98817
	15,005	1	7,51125	Dilution factor	1
	15,005	2,5	15,41213	Injection vol (µl)	1
	15,005	5	25,88469	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 1,23556}{5,11456 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Table 6 Thymoquinone Standard

Standard	RT (min)	Concentration (pg/ml)	Curve area	Regression Equation	
thymoquinone	nd	0	0	a	0,50899
	18,614	0,1	0,82685	b	3,66924
	18,614	0,5	2,11265	R ²	0,99573
	18,614	1	4,86528	Dilution factor	1
	18,614	2,5	10,11265	Injection vol (µl)	1
	18,614	5	18,52655	Equation (µg/ml)	$\frac{\text{curve area} - 0,50899}{3,66924 \times \text{sample volume} \times 1000}$

Lampiran 9. Perhitungan kuantifikasi komponen utama minyak atsiri jintan hitam

Perhitungan kuantitatif komponen utama minyak atsiri pada biji, kontrol dan perlakuan elisitasi

p-cymene

Sample ID	Result (µg/ml)	m sample (g)	Result (µg/g)	Result (%)
Biji JH / jintan hitam	0.10743	0.104	103.30261	0.01033
SA 0 / kontrol	0.09667	0.101	95.70968	0.00957
SA1(1) / SA 50 µM	0.12143	0.108	112.43800	0.01124
SA2(1) / SA 100 µM	0.14334	0.103	139.16023	0.01392
SA3(1) / SA 150 µM	0.14512	0.105	138.21192	0.01382
SA4(1) / SA 200 µM	0.09882	0.106	93.22675	0.00932
MJ1(1) / MJ 50 µM	0.15525	0.107	145.09547	0.01451
MJ2(1) / MJ 100 µM	0.18946	0.103	183.94317	0.01839
MJ3(1) / MJ 150 µM	0.20348	0.105	193.79077	0.01938
MJ4(1) / MJ 200 µM	0.18187	0.102	178.30707	0.01783

α-thujene

Sample ID	Result (µg/ml)	m sample (g)	Result (µg/g)	Result (%)
Biji JH / jintan hitam	0.45120	0.104	433.84749	0.04338
SA 0 / kontrol	0.40605	0.101	402.02855	0.04020
SA1(1) / SA 50 µM	0.50990	0.108	472.12935	0.04721
SA2(1) / SA 100 µM	0.60174	0.103	584.21358	0.05842
SA3(1) / SA 150 µM	0.60924	0.105	580.22409	0.05802
SA4(1) / SA 200 µM	0.41508	0.106	391.58429	0.03916
MJ1(1) / MJ 50 µM	0.65171	0.107	609.07598	0.06091
MJ2(1) / MJ 100 µM	0.79516	0.103	771.99911	0.07720
MJ3(1) / MJ 150 µM	0.77182	0.105	735.06960	0.07351
MJ4(1) / MJ 200 µM	0.76334	0.102	748.37231	0.07484

β-pinene

Sample ID	Result (µg/ml)	m sample (g)	Result (µg/g)	Result (%)
Biji JH / jintan hitam	0.71757	0.104	689.97497	0.06900
SA 0 / kontrol	0.64578	0.101	639.39003	0.06394
SA1(1) / SA 50 µM	0.81090	0.108	750.83428	0.07508
SA2(1) / SA 100 µM	0.95692	0.103	929.05046	0.09291
SA3(1) / SA 150 µM	0.96884	0.105	922.70392	0.09227
SA4(1) / SA 200 µM	0.66014	0.106	622.77541	0.06228
MJ1(1) / MJ 50 µM	1.03637	0.107	968.57346	0.09686
MJ2(1) / MJ 100 µM	1.26445	0.103	1227.61904	0.12276
MJ3(1) / MJ 150 µM	1.22734	0.105	1168.89967	0.11689
MJ4(1) / MJ 200 µM	1.21386	0.102	1190.05554	0.11901

thymol

Sample ID	Result (µg/ml)	m sample (g)	Result (µg/g)	Result (%)
Biji JH / jintan hitam	0.64208	0.104	617.38649	0.06174
SA 0 / kontrol	0.57785	0.101	572.12832	0.05721
SA1(1) / SA 50 µM	0.72558	0.108	671.83705	0.06718
SA2(1) / SA 100 µM	0.85623	0.103	831.29380	0.08313
SA3(1) / SA 150 µM	0.86690	0.105	825.61447	0.08256
SA4(1) / SA 200 µM	0.59070	0.106	557.26044	0.05573
MJ1(1) / MJ 50 µM	0.92732	0.107	866.65418	0.08667
MJ2(1) / MJ 100 µM	1.13138	0.103	1098.43060	0.10984
MJ3(1) / MJ 150 µM	1.09819	0.105	1045.89198	0.10459
MJ4(1) / MJ 200 µM	1.08612	0.102	1064.82207	0.10648

thymoquinone

Sample ID	Result (µg/ml)	m sample (g)	Result (µg/g)	Result (%)
Biji JH / jintan hitam	1.31728	0.104	1266.61442	0.12666
SA 0 / kontrol	1.18554	0.101	1173.79924	0.11738
SA1(1) / SA 50 µM	1.48854	0.108	1378.28084	0.13783
SA2(1) / SA 100 µM	1.75651	0.103	1705.34570	0.17053
SA3(1) / SA 150 µM	1.77838	0.105	1693.69067	0.16937
SA4(1) / SA 200 µM	1.21189	0.106	1143.28828	0.11433
MJ1(1) / MJ 50 µM	1.90231	0.107	1777.85755	0.17779
MJ2(1) / MJ 100 µM	2.32085	0.103	2253.24832	0.22532
MJ3(1) / MJ 150 µM	2.36177	0.105	2249.30725	0.22493
MJ4(1) / MJ 200 µM	2.22801	0.102	2184.31999	0.21843

Lampiran 10. Sertifikat Bebas Plagiasi



Lampiran Gambar 10.1 Sertifikat Bebas Plagiasi